



**Ana Filipa Alves Silva**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Métodos Analíticos para  
controlo de Qualidade de um Medicamento,  
por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
(HPLC)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos  
Penedo, Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimed S.A.  
Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia –  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Eng.<sup>a</sup> Clárisse Lourenço dos Santos Penedo



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2016

**Ana Filipa Alves Silva**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Métodos Analíticos para  
controlo de Qualidade de um Medicamento,  
por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
(HPLC)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos  
Penedo, Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimede S.A.  
Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia –  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Eng.<sup>a</sup> Clárisse Lourenço dos Santos Penedo

**Setembro de 2016**

“Validação de Métodos Analíticos para Controlo de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ” *Copyright ©*, Ana Filipa Alves Silva, FCT/UNL e UNL.

#### **Indicação dos direitos de cópia**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

#### ***Copyright ©***

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any means known or to be invented, and to divulge through scientific repositories and admit your copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as the credit is given to the author and editor.

## **AGRADECIMENTOS**

Após a conclusão deste relatório, quero mostrar o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização.

Deste modo agradeço:

Ao Grupo Tecnimede, em especial ao Dr. João Serra pela oportunidade de realizar este estágio na empresa.

À Eng.<sup>a</sup> Clarisse Penedo, pela sua orientação, apoio e disponibilidade, pelo conhecimento que transmitiu e total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Ao professor Mário Eusébio, pela orientação na elaboração desta dissertação.

A todos os colaboradores do laboratório de ensaios, que me receberam e trataram com muita simpatia, pela camaradagem e partilha de conhecimentos. Em especial à Diana Parreira pela amizade, companheirismo e ajuda ao longo destes seis meses.

Aos meus amigos, em particular à minha colega de mestrado Rita Soares pela amizade ao longo destes anos.

À minha irmã e ao meu irmão que sempre me apoiaram nos bons e maus momentos.

Um agradecimento especial aos meus pais, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade, e ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo. Sem eles não teria sido possível.



## RESUMO

Nos últimos anos uma consciencialização por parte dos consumidores relativamente à qualidade dos produtos levou a implementação de programas de controlo e garantia de qualidade, sendo a validação de métodos analíticos uma das ferramentas essenciais para o estabelecimento de um elevado padrão de qualidade.

Neste trabalho é descrita a validação de um método analítico envolvendo o método cromatográfico HPLC, tendo sido validados os ensaios de Doseamento, Dissolução e Compostos Relacionados. Os métodos foram validados tendo-se com referência as condições definidas pela farmacopeia dos Estados Unidos e a farmacopeia Europeia, e os ensaios foram validados de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH). Os resultados obtidos foram apresentados num relatório de validação analítica que contém toda a informação referente aos ensaios validados. Os ensaios validados demonstraram ser seletivos, específicos, exatos, precisos, robustos e lineares na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação estabelecidos. Concluindo-se assim que os métodos desenvolvidos e validados são adequados para a finalidade proposta.

Na tabela abaixo encontra-se um resumo dos resultados obtidos para os ensaios validados.

	Doseamento	Compostos Relacionados	Dissolução
<b>Adequabilidade do Sistema</b>	Fator de Simetria = 1.32 RSD = 0.25%	Resolução Imp. A e Imp D2= 1.73 RSD = 0.89%	Fator de Simetria = 1.13 Fator de Capacidade = 1.47 Pratos teóricos = 5815.67 RSD = 0.55%
<b>Especificidade</b>	Não se verifica a presença de picos interferentes ao tempo de retenção do pico da substância ativa.	Não se verifica interferências por parte da substância ativa, dos componentes do placebo ou de quaisquer outros produtos de degradação.	Não se verifica a presença de picos interferentes ao tempo de retenção do pico da substância ativa.
<b>Repetibilidade do Sistema</b>	RSD = 0.25%	RSD = 0.89%	RSD = 0.55%
<b>Repetibilidade do Ensaio</b>	RSD = 0.35%	RSD (0.1%) = 1.02% RSD (1.0%) = 0.48% RSD Imp.A= 0.93% RSD Imp.B= 1.28% RSD Imp.C= 0.98% RSD Imp.D= 1.41% RSD Imp.F= 0.39% RSD Imp.G= 0.68% RSD Imp I= 0.56%	RSD = 0.31%
<b>Precisão Intermédia</b>	RSD = 0.26%	RSD (0.1%) = 0.96% RSD (1.0%) = 2.07%	RSD = 2.43%
<b>Exatidão</b>	Recuperação = 99.80%	Recuperação (0.1%) = 96.91% Recuperação (1.0%) = 98.79% Recuperação Imp.A = 101.06% Recuperação Imp.B = 92.54% Recuperação Imp.C = 87.47% Recuperação Imp.D = 93.46% Recuperação Imp.F = 101.41%	Recuperação = 100.23%

		Recuperação Imp.G = 102.75% Recuperação Imp I = 100.85%	
<b>Linearidade</b>	$r = 0.999$ $r^2 = 0.999$	$r = 0.99$ $r^2 = 0.99$ Para todas as impurezas estudadas	$r = 0.99$ $r^2 = 0.99$
<b>Robustez</b>	RSD = 0.24%	RSD (0.1%) = 98.89% RSD (1.0%) = 99.32%	RSD max= 1.47% RSD total sets= 1.19%
<b>Limite de detecção</b>	-----	RSD (ativo) = 1.60 % RSD Imp.A = 1.09 % RSD Imp.B = 1.33% RSD Imp.C = 6.10% RSD Imp.D = 2.10% RSD Imp.F = 11.93% RSD Imp.G = 3.05% RSD Imp I = 5.56%	-----
<b>Limite de Quantificação</b>	-----	RSD (ativo) = 1.04% RSD Imp.A= 0.24% RSD Imp.B= 0.23% RSD Imp.C= 1.80% RSD Imp.D= 0.13% RSD Imp.F= 0.77% RSD Imp.G= 2.29% RSD Imp I= 0.77%	-----
<b>Fator de Resposta</b>	-----	FR Imp.A= 0.36 FR Imp.B= 0.54 FR Imp.C= 1.28 FR Imp.D= 0.65 FR Imp.F= 1.53 FR Imp.G= 0.42 FR Imp I= 0.85	-----

Palavras-chave: Validação de Métodos Analíticos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Qualidade, Indústria Farmacêutica.

## ABSTRACT

Recently in the last few years, a growing awareness among consumers regarding the quality of products has led to an implementation of quality control programs, on which the validation of analytical methods is one of the essential tools for establishing a high quality standard.

In this document is described the validation of analytical method evolving high performance liquid chromatography (HPLC), where the assay, dissolution and related compounds tests were validated.

The methods were validated taking as reference the conditions established in the United States Pharmacopeia and the European Pharmacopeia and the tests were validated in accordance with the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH).

A validation report containing all the information on the validated assays was produced. The tests validated were proved to be selective, specific, accurate, precise, robust and linear in the working range, fulfilling all the acceptance criteria and having satisfactory results for all parameters satisfactory. In conclusion, the methods developed are suitable for its purpose.

In the table below is a summary of the results obtained for the validated tests.

	Assay	Related Substances	Dissolution
<b>System suitability</b>	Tailing = 1.32 RSD = 0.25%	Resolution Imp. A e Imp D2= 1.73 RSD = 0.89%	Tailing = 1.13 Capacity factor = 1.47 Theoretical plates = 5815.67 RSD = 0.55%
<b>Specificity</b>	The presence of interfering peaks in the peak retention time of the active substance is not observed.	There is no interference from the active substance, the placebo components or any other degradation products.	The presence of interfering peaks in the peak retention time of the active substance is not observed.
<b>System repeatability</b>	RSD = 0.25%	RSD = 0.89%	RSD = 0.55%
<b>Method repeatability</b>	RSD = 0.35%	RSD (0.1%) = 1.02% RSD (1.0%) = 0.48% RSD Imp.A = 0.93% RSD Imp.B = 1.28% RSD Imp.C = 0.98% RSD Imp.D = 1.41% RSD Imp.F = 0.39% RSD Imp.G = 0.68% RSD Imp I = 0.56%	RSD = 0.31%
<b>Intermediate Precision</b>	RSD = 0.26%	RSD (0.1%) = 0.96% RSD (1.0%) = 2.07%	RSD = 2.43%
<b>Accuracy</b>	Recovery = 99.80%	Recovery (0.1%) = 96.91% Recovery (1.0%) = 98.79% Recovery Imp.A = 101.06% Recovery Imp.B = 92.54% Recovery Imp.C = 87.47% Recovery Imp.D = 93.46% Recovery Imp.F = 101.41% Recovery Imp.G = 102.75% Recovery Imp I = 100.85%	Recovery = 100.23%



<b>Linearity</b>	r= 0.999 r <sup>2</sup> = 0.999	r= 0,99 r <sup>2</sup> = 0,99 For all impurities studied	r= 0,99 r <sup>2</sup> = 0,99
<b>Robustness</b>	RSD = 0.24%	RSD (0.1%) =98.89% RSD (1.0%) = 99.32%	RSD max= 1.47% RSD total sets= 1.19%
<b>Detection limit</b>	-----	RSD (active) = 1.60 % RSD Imp.A = 1.09 % RSD Imp.B = 1.33% RSD Imp.C = 6.10% RSD Imp.D = 2.10% RSD Imp.F = 11.93% RSD Imp.G = 3.05% RSD Imp I = 5.56%	-----
<b>Quantification limit</b>	-----	RSD (active) = 1.04% RSD Imp.A= 0.24% RSD Imp.B= 0.23% RSD Imp.C= 1.80% RSD Imp.D= 0.13% RSD Imp.F= 0.77% RSD Imp.G= 2.29% RSD Imp I= 0.77%	-----
<b>Response Factor</b>	-----	RF Imp.A= 0.36 RF Imp.B= 0.54 RF Imp.C= 1.28 RF Imp.D= 0.65 RF Imp.F= 1.53 RF Imp.G= 0.42 RF Imp I= 0.85	-----

Keywords: Validation of analytical methods, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Quality, Pharmaceutical Industry.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiii
ABREVIATURAS/ SIGLAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. ENQUADRAMENTO .....	1
1.1.1. Boas Práticas de Laboratório .....	1
1.1.2. Acreditação de Laboratórios - Norma NP EN ISO/IEC 17025 .....	2
1.2. O GRUPO TECNIMEDE .....	2
1.3. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO .....	3
1.4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	3
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	4
2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	4
2.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	7
2.2.1. Parâmetros da Validação de Métodos Analíticos .....	8
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	11
3.1. DOSEAMENTO .....	11
3.1.1. Adequabilidade do Sistema .....	12
3.1.2. Especificidade .....	13
3.1.3. Repetibilidade do Sistema .....	16
3.1.4. Repetibilidade do Ensaio .....	17
3.1.5. Precisão Intermédia .....	17
3.1.6. Exatidão .....	18
3.1.7. Linearidade .....	19
3.1.8. Robustez .....	21
3.2. COMPOSTOS RELACIONADOS .....	22
3.2.1. Adequabilidade do Sistema .....	24
3.2.2. Especificidade .....	25
3.2.3. Repetibilidade do Sistema .....	35
3.2.4. Repetibilidade do Ensaio .....	35
3.2.5. Precisão Intermédia .....	36
3.2.6. Exactidão .....	37
3.2.7. Linearidade .....	41
3.2.8. Factor de Resposta .....	51

3.2.9.	Limite de Detecção .....	52
3.2.10.	Limite de Quantificação.....	53
3.2.11.	Robustez.....	54
3.3.	EVIDÊNCIA DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO COMO INDICADOR DE ESTABILIDADE .....	56
3.4.	DISSOLUÇÃO .....	58
3.4.1.	Adequabilidade do sistema .....	60
3.4.2.	Especificidade .....	61
3.4.3.	Repetibilidade do Sistema.....	64
3.4.4.	Repetibilidade do Ensaio.....	65
3.4.5.	Precisão Intermédia.....	66
3.4.6.	Exatidão .....	67
3.4.7.	Linearidade .....	67
3.4.8.	Robustez.....	69
4.	CONCLUSÕES.....	71
	BIBLIOGRAFIA .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Componentes de um sistema HPLC. ....	4
Figura 2.2 Cálculo do tempo de retenção. ....	6
Figura 2.3 Cálculo da Resolução. ....	6
Figura 2.4 Cálculo do fator de Simetria. ....	7
Figura 3.1 Cromatograma da Solução Padrão - Doseamento. ....	14
Figura 3.2 Cromatograma da Solução Amostra - Doseamento. ....	14
Figura 3.3 Cromatograma da Solução de Placebo - Doseamento. ....	15
Figura 3.4 Cromatograma do Solvente – Doseamento. ....	15
Figura 3.5 Recta da Regressão Linear - Doseamento. ....	20
Figura 3.6 Distribuição de Resíduos - Doseamento. ....	20
Figura 3.7 Cromatograma da Solução Resolução – Compostos Relacionados. ....	27
Figura 3.8 Cromatograma da Solução Padrão – Compostos Relacionados. ....	27
Figura 3.9 Cromatograma da Solução Amostra – Compostos Relacionados. ....	28
Figura 3.10 Cromatograma da Solução de Placebo – Compostos Relacionados. ....	28
Figura 3.11 Cromatograma da Solução da Imp A – Compostos Relacionados. ....	29
Figura 3.12 Cromatograma da Solução da Imp B – Compostos Relacionados. ....	29
Figura 3.13 Cromatograma da Solução da Imp C – Compostos Relacionados. ....	30
Figura 3.14 Cromatograma da Solução da Imp D – Compostos Relacionados. ....	30
Figura 3.15 Cromatograma da Solução da Imp D + E – Compostos Relacionados. ....	31
Figura 3.16 Cromatograma da Solução da Imp F – Compostos Relacionados. ....	31
Figura 3.17 Cromatograma da Solução da Imp G – Compostos Relacionados. ....	32
Figura 3.18 Cromatograma da Solução da Imp I – Compostos Relacionados. ....	32
Figura 3.19 Cromatograma da Solução da Imp J – Compostos Relacionados. ....	33
Figura 3.20 Cromatograma da Solução Amostra fortificada com cada impureza – Compostos Relacionados. ....	33
Figura 3.21 Cromatograma da Solução A – Compostos Relacionados. ....	34
Figura 3.22 Cromatograma da Solução B – Compostos Relacionados. ....	34
Figura 3.23 Recta da Regressão Linear – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%). ....	43
Figura 3.24 Distribuição de Resíduos – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%). ....	43
Figura 3.25 Recta da Regressão Linear – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%). ....	44
Figura 3.26 Distribuição de Resíduos – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%). ....	44
Figura 3.27 Recta da Regressão Linear – Imp A. ....	45
Figura 3.28 Distribuição de Resíduos – Imp A. ....	45
Figura 3.29 Recta da Regressão Linear – Imp B. ....	46
Figura 3.30 Distribuição de Resíduos – Imp B. ....	46
Figura 3.31 Recta da Regressão Linear – Imp C. ....	47
Figura 3.32 Distribuição de Resíduos – Imp C. ....	47
Figura 3.33 Recta da Regressão Linear – Imp D. ....	48
Figura 3.34 Distribuição de Resíduos – Imp D. ....	48
Figura 3.35 Recta da Regressão Linear – Imp F. ....	49
Figura 3.36 Distribuição de Resíduos – Imp F. ....	49
Figura 3.37 Recta da Regressão Linear – Imp G. ....	50
Figura 3.38 Distribuição de Resíduos – Imp G. ....	50
Figura 3.39 Recta da Regressão Linear – Imp I. ....	51
Figura 3.40 Distribuição de Resíduos – Imp I. ....	51
Figura 3.41 Cromatograma da Solução Padrão – Dissolução. ....	62
Figura 3.42 Cromatograma da Solução Amostra – Dissolução. ....	62
Figura 3.43 Cromatograma da Solução de Placebo – Dissolução. ....	63
Figura 3.44 Cromatograma do Meio de Dissolução– Dissolução. ....	63
Figura 3.45 Cromatograma do Branco – Dissolução. ....	64
Figura 3.46 Recta da Regressão Linear – Dissolução. ....	68
Figura 3.47 Distribuição de Resíduos – Dissolução. ....	69



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Condições cromatográficas para o ensaio de Doseamento. ....	11
Tabela 3.2 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Doseamento. ....	13
Tabela 3.3 Resultados da Especificidade para o ensaio de Doseamento. ....	14
Tabela 3.4 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Doseamento. ....	16
Tabela 3.5 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio do Doseamento. ....	17
Tabela 3.6 Resultados da Precisão Intermédia do ensaio de Doseamento. ....	18
Tabela 3.7 Resultados da Exatidão do ensaio de Doseamento. ....	19
Tabela 3.8 Resultados da Linearidade do ensaio de Doseamento. ....	20
Tabela 3.9 Resultados da Robustez do ensaio de Doseamento. ....	21
Tabela 3.9 Condições cromatográficas para o ensaio de Compostos Relacionados. ....	22
Tabela 3.11 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Compostos Relacionados. ....	24
Tabela 3.12 Resultados da Especificidade do ensaio de Compostos Relacionados. ....	25
Tabela 3.13 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Compostos Relacionados. ....	35
Tabela 3.14 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio de Compostos Relacionados. ....	36
Tabela 3.15 Resultados da Precisão Intermédia para o ensaio de Compostos Relacionados. ....	37
Tabela 3.16 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%). ....	38
Tabela 3.17 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1%). ....	38
Tabela 3.18 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza A. ....	39
Tabela 3.19 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza B. ....	39
Tabela 3.20 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza C. ....	39
Tabela 3.21 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza D. ....	40
Tabela 3.22 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza F. ....	40
Tabela 3.23 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza G. ....	40
Tabela 3.24 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza I. ....	41
Tabela 3.25 Factor de Correção para as impurezas. ....	41
Tabela 3.26 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%). ....	42
Tabela 3.27 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%). ....	43
Tabela 3.28 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp A. ....	44
Tabela 3.29 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp B. ....	45
Tabela 3.30 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp C. ....	46
Tabela 3.31 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp D. ....	47
Tabela 3.32 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp F. ....	48
Tabela 3.33 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp G. ....	49
Tabela 3.34 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp I. ....	50
Tabela 3.35 Fatores de resposta das impurezas conhecidas. ....	52
Tabela 3.36 Limites de Detecção – Concentrações. ....	52
Tabela 3.37 Resultados dos Limites de Detecção. ....	53
Tabela 3.38 Limites de Quantificação – Concentrações. ....	53
Tabela 3.39 Resultados dos Limites de Quantificação. ....	54
Tabela 3.40 Robustez do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%). ....	55
Tabela 3.41 Robustez do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%). ....	55
Tabela 3.42 Estabilidade intra-diária da solução padrão. ....	56
Tabela 3.43 Resultados das degradações forçadas – Produto Acabado. ....	57
Tabela 3.44 Resultados das degradações forçadas – Matéria-Prima. ....	57
Tabela 3.45 Condições do ensaio de dissolução. ....	59
Tabela 3.46 Condições cromatográficas para o ensaio de Dissolução. ....	59
Tabela 3.47 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Dissolução. ....	61
Tabela 3.48 Resultados da Especificidade para o ensaio de Dissolução. ....	61
Tabela 3.49 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Dissolução. ....	65
Tabela 3.50 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio de Dissolução. ....	65
Tabela 3.51 Resultados da Precisão Intermédia do ensaio de Dissolução. ....	66
Tabela 3.52 Resultados da Exatidão do ensaio de Dissolução. ....	67
Tabela 3.53 Resultados da Linearidade do ensaio de Dissolução. ....	68

Tabela 3.54 Resultados da Robustez do ensaio de Dissolução.....	70
---	----

## ABREVIATURAS/ SIGLAS

<b>BPL</b>	Boas Práticas de Laboratório
<b>INFARMED</b>	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.
<b>IPQ</b>	Instituto Português da Qualidade
<b>OCDE</b>	Organização para a cooperação e Desenvolvimento Económico
<b>IPAC</b>	Instituto Português de Acreditação
<b>HPLC</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization</i>
<b>S.D</b>	<i>Standard deviation</i> (Desvio padrão)
<b>R.S.D</b>	<i>Relative standard deviation</i> (Desvio padrão relativo)
<b>r</b>	Coeficiente de Correlação
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Determinação
<b>T.R</b>	Tempo de Retenção
<b>S/N</b>	Razão Sinal- Ruído





## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. ENQUADRAMENTO**

Nos últimos anos observou-se um grande avanço na implementação de programas de qualidade na indústria farmacêutica. O crescimento do mercado, a competitividade entre laboratórios e a maior consciencialização por parte dos consumidores relativamente à qualidade dos produtos contribuíram para esta mudança. É cada vez mais importante garantir que os produtos sejam produzidos de forma criteriosa, mantendo-se em todas as etapas do ciclo produtivo elevados os padrões de exigência em matéria de qualidade, segurança e eficácia. Com este objetivo foram estabelecidas diretrizes que visam erradicar os erros que podem aparecer durante o processo de manufatura, por forma a garantir que os produtos sejam adequados ao uso indicado. Os sistemas de gestão de qualidade vieram assegurar o cumprimento de requisitos relacionados com a segurança, qualidade e eficácia do medicamento.

No âmbito do controlo de qualidade dos medicamentos a validação das metodologias analíticas é uma das ferramentas essenciais para estabelecer um alto padrão de qualidade uma vez que é um processo que atesta que o mesmo é adequado ao fim a que se destina. O processo de validação de métodos analíticos deve satisfazer os requisitos técnicos e legais estabelecidos pelas autoridades reguladoras e diretivas vigentes do sector farmacêutico.<sup>[1,2]</sup>

#### **1.1.1. Boas Práticas de Laboratório**

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um sistema de qualidade aplicado ao processo organizativo e às condições sob as quais os ensaios são realizados. Neste são considerados todos os procedimentos necessários à execução dos ensaios, as infraestruturas e a formação dos colaboradores, promovendo-se desta forma a obtenção de dados e resultados de ensaio de qualidade comprovada e reconhecida. A administração de cada instalação de ensaio deve garantir que os princípios das BPL são cumpridos e deve assegurar que o pessoal envolvido tem a competência necessária para o desempenho das suas funções, e deve disponibilizar os recursos necessários para a realização do ensaio.

As BPL facilitam também a comercialização, favorecendo a troca de informação e contribuindo para a proteção da saúde humana e do ambiente.

Em Portugal, as autoridades competentes para a avaliação e verificação da implementação das BPL nos laboratórios são a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED), e o Instituto Português da Qualidade I.P. (IPQ).

A certificação de conformidade com as BPL é concedida a qualquer instalação de ensaio (laboratório) nacional, público ou privado, que pretenda declarar aplicar as BPL e evidencie a conformidade com os Princípios da OCDE das Boas Práticas de Laboratório.<sup>[3,4,5]</sup>

### **1.1.2. Acreditação de Laboratórios - Norma NP EN ISO/IEC 17025**

Devido a constante necessidade de implementar métodos de trabalho que visem o rigor dos resultados obtidos pelos laboratórios de ensaio surgiu a norma NP EN ISO/IEC 17025.

A acreditação é um procedimento pelo qual um organismo autorizado, em Portugal o organismo de acreditação é o Instituto Português de Acreditação (IPAC), reconhece formalmente que uma organização é competente para executar determinadas tarefas. Tem por base a norma NP EN ISO/IEC 17025, Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, que apresenta os princípios técnicos e de gestão a serem seguidos para garantir a qualidade dos serviços prestados e demonstrar a sua competência técnica.<sup>[6]</sup>

## **1.2. O GRUPO TECNIMEDE**

O Grupo TECNIMEDE é um Grupo privado de empresas farmacêuticas e a sua atividade centra-se no desenvolvimento e comercialização de medicamentos de uso humano, tendo por missão contribuir para a melhoria da saúde e do acesso aos medicamentos, a nível mundial. Para o Grupo Tecnimed, a excelência no desempenho e na qualidade são um objetivo constante desde o início de cada projecto tendo implementado um Programa de Garantia da Qualidade, de forma a assegurar que os estudos são realizados em conformidade com estes princípios.

O Labor Qualitas é o pólo de Investigação e Desenvolvimento do Grupo Tecnimed sendo certificado pelo INFARMED para as Boas Práticas de Fabrico e pelo IPAC para a norma NP EN/IEC ISO 17025.<sup>[7]</sup>

### 1.3. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

O estágio curricular realizado no âmbito da Dissertação em Engenharia Química e Bioquímica teve como principal objetivo a validação de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram validados métodos analíticos usados no controlo de qualidade de um medicamento, nomeadamente os ensaios de doseamento, dissolução e compostos relacionados, tendo-se com referência as condições definidas pela farmacopeia dos Estados Unidos e a farmacopeia europeia, e os ensaios foram validados de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH). Por fim todos os resultados foram compilados num relatório de validação analítica que contem toda a informação referente aos ensaios validados.

### 1.4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em quatro capítulos:

#### 1. INTRODUÇÃO

Este capítulo visa fazer o enquadramento do trabalho realizado, desde a apresentação da empresa, passando por uma breve abordagem da importância dos sistemas de garantia de qualidade na atualidade.

#### 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Neste capítulo encontram-se conceitos teóricos que foram importantes na realização deste trabalho, nomeadamente conceitos e procedimentos necessários ao processo de validação de métodos analíticos.

#### 2. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

No capítulo três encontram-se os resultados obtidos nos diversos parâmetros que fazem parte do processo de validação de métodos analíticos estudados.

#### 3. CONCLUSÃO

No capítulo 4 são apresentadas as principais conclusões referentes ao estudo realizado.

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography) tornou-se essencial na obtenção de resultados analíticos num laboratório sendo atualmente bastante utilizada na indústria farmacêutica uma vez que tem a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos presentes numa mistura. O seu principal objetivo é então separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura por meio de uma interação entre as moléculas da amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel.

Os seus principais componentes são um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detetor e um sistema que permite registar e fazer o tratamento da resposta analítica do detetor – software e computador.

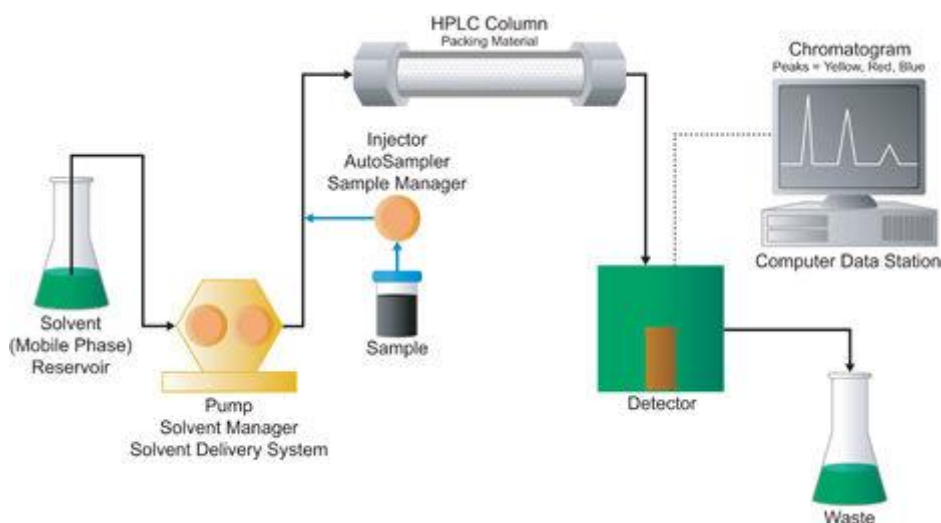


Figura 2.1 Componentes de um sistema HPLC.

O sistema de bombas tem como função promover a circulação da fase móvel, a um determinado fluxo, ao longo de todo o sistema cromatográfico, podendo ser programado para efetuar a introdução dos componentes da fase móvel em proporções variáveis, chamada de eluição em gradiente, ou a uma proporção constante, designando-se neste caso eluição isocrática. A fase móvel flui continuamente através do sistema arrastando a amostra injetada, pelo sistema de injeção, através da fase estacionária constituída pela coluna cromatográfica.

A separação dos componentes da solução amostra ocorre mediante a interação dos mesmos simultaneamente com a fase móvel e a fase estacionária. As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de afinidade com as fases móvel e estacionária e por conseguinte as suas velocidades de migração

serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se então concluir que a substância com maior afinidade com a coluna é aquela que elui por último e, por oposição, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor afinidade com a fase estacionária. [8,9]

As diferentes interações que ocorrem na coluna cromatográfica podem ser classificadas como: partição, adsorção, exclusão ou troca iónica. A classificação da separação deve-se aos diferentes tipos de enchimento na coluna cromatográfica, pelo que a sua seleção para uma determinada análise, influencia significativamente o método de separação, podendo este ser afetado tanto na seletividade como na eficiência de separação dos analitos de interesse.

A separação pode se fazer por fase normal ou por fase reversa de acordo com a polaridade das fases de separação do sistema. Em fase normal, a fase estacionária é polar (normalmente o enchimento é composto de sílica) e a fase móvel apolar. Neste caso os analitos polares ficam retidos mais tempo na coluna enquanto os analitos com menor polaridade têm mais afinidade pela fase móvel e são eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica. Na fase reversa a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar (geralmente utiliza-se sílica modificada quimicamente com cadeias de hidrocarbonetos, vulgarmente chamadas de colunas C8 e C18 classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionados à estrutura base de sílica), sendo neste caso os compostos menos polares, os mais retidos na coluna. Este último tipo de separação é o que tem uma maior gama de aplicabilidade.

Ao sair da coluna, os componentes seguem para o detetor que deve ser escolhido de modo a ter a sensibilidade para registar as diferentes variações de sinal das concentrações dos analitos que são separados pelo sistema. Existem vários tipos de detectores, sendo que a escolha dependerá fortemente das características químicas ou físicas das espécies a se detectar. Os detectores de HPLC devem possuir várias características, entre elas: Alta sensibilidade, seletividade, linearidade (correspondente a aumento da concentração do analito), pouco sensível às variações de temperatura e fluxo, preciso e com reprodutibilidade.

Os detectores de UV-visível são os detectores mais utilizados em HPLC, pois apresentam baixo custo, aceitam o uso de gradiente e geralmente não são afetados por pequenas mudanças de fluxo e temperatura. Consiste em um fotômetro que mede a absorção de luz pelos compostos, em certo comprimento de onda, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta.

O princípio da detecção por UV-vis pode ser definido através da concentração do analito relacionada à fração da luz transmitida pela célula do detector pela lei de Lambert-Beer:

$$A = b.c. \epsilon$$

Onde:

A - Absorbância ;

$\epsilon$  – Coeficiente de absorção molar da espécie em estudo;

- b –Distância percorrida pela radiação através da solução;
- c- Concentração molar da espécie em solução.

Os dados obtidos pelo detetor são enviados para um sistema de aquisição de dados, que através de um software processa a informação na forma de um cromatograma.

Da análise dos cromatogramas obtidos pode se obter vários parâmetros que caracterizam a separação como:

- Tempo de retenção ( $t_R$ ): Corresponde ao tempo gasto desde a injeção de um componente até a sua detecção na saída do sistema.

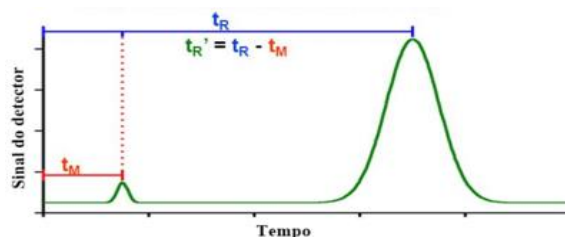


Figura 2.2 Cálculo do tempo de retenção.

- Fator de retenção ( $k$ ): Mede a capacidade de um sistema cromatográfico de reter os componentes da amostra.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

- Seletividade ( $\alpha$ ): Capacidade do sistema em promover a separação entre picos adjacentes.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

- Resolução ( $R$ ): Medida da separação de dois picos adjacentes.

$$R = 2 * \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \right)$$

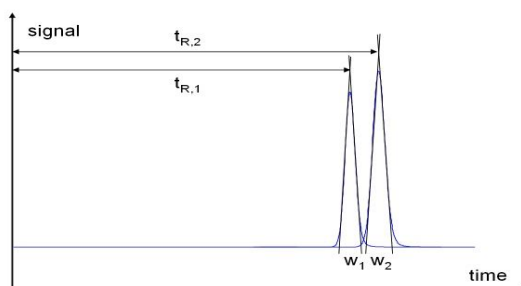


Figura 2.3 Cálculo da Resolução.

- Fator de simetria (T): Medida de simetria do pico.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

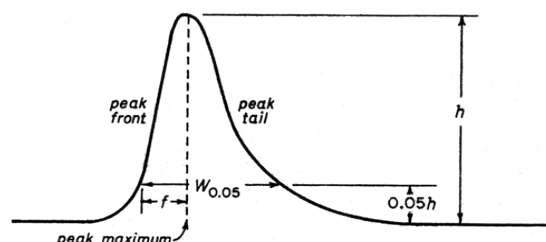


Figura 2.4 Cálculo do fator de Simetria.

Em suma, esta técnica é amplamente utilizada uma vez que apresenta várias vantagens tais como a utilização de pequenos volumes de fase móvel, bem como menores quantidades de analito, alto poder de resolução, separações rápidas, monitorização contínua do eluente, medidas quantitativas aperfeiçoadas, análises repetitivas e reproduzíveis com a mesma coluna e automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados. Apresenta como principal desvantagem o facto de ser dispendioso, devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção e calibração periódica associada. De salientar ainda os custos associados à recolha seletiva de resíduos recolhidos à saída do detetor – uma vez que as fases móveis contêm na sua composição solventes orgânicos. [10,11,12]

## 2.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Como referido anteriormente é cada vez mais importante a existência de um sistema de controlo e garantia de qualidade. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Resultados não fiáveis podem colocar em causa a metodologia e consequentemente, neste caso em particular a saúde do consumidor. Desta forma e para um controlo efetivo dos resultados e de modo a garantir a correta interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação.

A validação pode ser descrita então como um processo que permite demonstrar que um método é adequado para o fim proposto garantindo assim resultados fiáveis. O objetivo fundamental da validação é então confirmar que as características do método satisfazem as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controlo a aplicar no trabalho de rotina. É essencial que o protocolo de validação se encontre descrito num



procedimento laboratorial e que a determinação dos parâmetros de validação seja efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, devidamente qualificados e calibrados.

A validação embora possa ser uma atividade exigente e morosa, é necessária, pois as consequências de um método não validado podem traduzir-se em resultados erróneos – com consequência direta ou indireta de desperdício de tempo, dinheiro e recursos e podendo colocar em causa a avaliação rigorosa e fiável do produto. <sup>[13,14]</sup>

### **2.2.1. Parâmetros da Validação de Métodos Analíticos**

Os parâmetros a avaliar, aquando de uma validação de um método analítico, encontram-se descritos na “ICH-*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”.

A validação deve ser adaptada a cada caso, sendo necessário para tal o estudo e conhecimento de diversos parâmetros tais como Especificidade; Linearidade; Exatidão; Precisão; Limites de deteção e quantificação e Robustez. Sendo estes aplicados ou não consoante o tipo de procedimento analítico.

De seguida encontram-se enumerados todos os parâmetros de validação de um método analítico documentados para a indústria farmacêutica. <sup>[15]</sup>

#### **❖ Adequabilidade do Sistema**

Consiste na capacidade do sistema analítico reportar um pico cromatográfico adequado no que respeita aos parâmetros de avaliação da qualidade cromatográfica, tais como resolução, tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de simetria e repetibilidade do sistema.

#### **❖ Especificidade**

A especificidade é a capacidade de um ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação de um determinado composto, relativamente a outros de estrutura semelhante ou não, presentes na mesma matriz. Mede o grau de interferência no ensaio dos restantes componentes do sistema ou da matriz.

#### **❖ Linearidade**

A linearidade é a capacidade de um ensaio reportar, numa determinada gama de concentrações, resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito.

Aplicando-se o método dos desvios quadrados (regressão linear) é possível obter-se o valor do declive, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Pelo valor do declive pode-se ainda concluir sobre a sensibilidade do método (quanto maior o declive maior a sensibilidade do método).

### ❖ **Exatidão**

A exatidão avalia o grau de aproximação entre um valor obtido experimentalmente e o seu valor teórico. Deve ser comprovada no intervalo de concentrações a reportar como validado – gama de trabalho.

Em suma representa a taxa de recuperação da quantidade de analito existente na amostra preparada e na sua avaliação deve-se ter em conta os factores a seguir indicados:

- Taxas de recuperação baixas ( $< 100\%$ ): Poderão indicar que o modo de preparação da amostra tem de ser optimizado/melhorado (alteração do solvente, tempo de agitação..);
- Taxas de recuperação elevadas ( $> 100\%$ ): Poderá indicar que outros componentes da matriz têm resposta analítica quantificável ao comprimento de onda da análise podendo constituir então uma interferência à mesma;
- Variação inerente à repetibilidade do método.

Para contemplar o efeito dos 3 factores indicados acima, são estabelecidos limites de aceitação que constituem uma tolerância, em torno do 100% e que garante assim que tal desvio de Exatidão não colocará em causa a fiabilidade do método.

### ❖ **Precisão**

A precisão reflete o grau de concordância entre os resultados obtidos para uma determinada acção repetida  $n$  vezes, permitindo avaliar o grau de interferência gerada pelos erros aleatórios. Neste âmbito a precisão é considerada em três níveis.

#### **1. Repetibilidade do Sistema:**

É a medida da variabilidade inerente ao sistema cromatográfico.

#### **2. Repetibilidade do Ensaio:**

Traduz a medida da variabilidade inerente ao ensaio, incorporando a variabilidade do procedimento experimental utilizado na preparação das amostras.

### **3. Precisão intermedia:**

Traduz a medida da variabilidade intra-laboratorial do ensaio na instalação de ensaio, introduzida com a alteração do operador, do equipamento e do dia de análise.

#### **❖ Limites de Detecção e Quantificação**

##### **- Limite de detecção (LD)**

É a menor quantidade de analito que se pode detetar acima do ruído de fundo do sistema de análise.

##### **- Limite de quantificação (LQ)**

O limite de quantificação consiste na menor concentração de um analito que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida, de modo que o método terá de ser exato, preciso e linear nesse ponto.

#### **❖ Robustez**

A robustez é a capacidade de um método analítico não ser afetado na consistência dos resultados que reporta, em função de ligeiras alterações dos seus parâmetros analíticos (Caudal, temperatura da coluna, proporção da fase móvel). Dá uma indicação da fiabilidade do método quando utilizado em rotina.

Adicionalmente a todos estes parâmetros é também importante fazer prova de que os métodos utilizados são adequados para a avaliação do produto no âmbito de estudos de estabilidade (monitorização da qualidade do produto ao longo do tempo e quantificação, nomeadamente dos teores de substância ativa e impurezas ou eventuais produtos de degradação).

Por forma a reproduzir as características do produto ao longo do tempo, são realizados ensaios de degradação forçada e feitas as respetivas quantificações para validação dos métodos analíticos de doseamento e compostos relacionados quanto à sua capacidade como indicadores de estabilidade do medicamento.

### 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Durante as várias fases de desenvolvimento e também para o controlo de qualidade de um produto farmacêutico são vários os ensaios utilizados de forma a controlar e comprovar a conformidade/qualidade do produto. Pelas características da molécula em estudo neste trabalho foram validados os ensaios de doseamento da substância ativa, quantificação dos compostos relacionados e dissolução por uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

O tipo de cromatografia líquida utilizada neste trabalho foi a cromatografia de partição em sistema de fase reversa. O detetor utilizado foi um detetor de fotodíodos e o comprimento de onda selecionado foi aquele ao qual o analíto apresenta resposta analítica máxima, sem que nesse valor se encontrem interferências significativas dos restantes componentes da matriz de modo a se realizar uma análise com repetibilidade e sensibilidade para o método em causa.

Uma vez que a técnica de HPLC não é uma técnica de identificação estrutural, é analisada uma solução padrão de modo a ser possível identificar o analito na amostra conseguindo-se assim proceder a identificação da molécula de forma inequívoca.

A seguir estão apresentados os principais resultados obtidos durante a validação dos diferentes ensaios encontrando-se em anexo o relatório de validação analítica a enviar ao cliente. Este documento é confidencial contendo toda a informação referente aos métodos validados (Doseamento, Dissolução e Compostos Relacionados). Nele estão descritos todos os resultados obtidos para cada parâmetro de validação bem como alguns cromatogramas, as substâncias de referência utilizadas, reagentes e equipamentos, e também a descrição da preparação de soluções utilizadas durante a validação.

#### 3.1. DOSEAMENTO

No ensaio de Doseamento o objetivo é quantificar a substância ativa presente na amostra.

Condições cromatográficas:

Tabela 3.1 Condições cromatográficas para o ensaio de Doseamento.

<b>Coluna</b>	Lichrospher RP-18 250x4.0mm, 10 µm
<b>Fluxo</b>	1 mL/min
<b>Volume de injeção</b>	10 µL
<b>Fase Móvel</b>	Solução A: Solução B (1:24, v/v)
<b>Temperatura da coluna</b>	Ambiente
<b>Detetor</b>	UV

<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>)</b>	230 nm
<b>Tempo da corrida</b>	10 minutos
<b>Solvente</b>	Solução B

- *Preparação de soluções*

**Fase Móvel**

A solução A e a solução B são misturados na proporção de 1:24 (v/v).

Solução A: Acetonitrilo.

Solução B: 6.8 g/L de fosfato de potássio monobásico em água. Ajustar o pH para  $5.0 \pm 0.1$  com uma solução de hidróxido de potássio a 45% (w/w).

**Solução padrão**

Pesar rigorosamente 30 mg de padrão de substância ativa e transferir para balão volumétrico de 25.0 mL. Completar o volume com a solução B.  $C \approx 1.2$  mg/mL da substância ativa hidratada  $\approx 1.0$  mg/mL substância anidra.

**Solução amostra**

Pesar 651 mg de produto acabado (equivale a 500 mg de substância activa) para um balão volumétrico de 500 mL. Juntar solução B até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 15 minutos. Completar o volume com solução B e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.

Os parâmetros validados foram a adequabilidade do sistema, a especificidade, a repetibilidade do sistema, a repetibilidade do ensaio, a precisão intermédia, a exatidão, a linearidade e a robustez. O método de doseamento foi ainda avaliado, em conjunto com o método de compostos relacionados, quanto à sua adequabilidade como indicador de estabilidade.

**3.1.1. Adequabilidade do Sistema**

A adequabilidade do sistema foi determinada através da injeção em sextuplicado de uma solução padrão preparada à concentração de trabalho estabelecida, calculando-se os parâmetros cromatográficos para os seis cromatogramas.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%;

Fator de simetria (T) inferior a 2.5.

- *Resultados*

Na tabela 3.2 estão apresentados os resultados para a adequabilidade do sistema.

Tabela 3.2 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Doseamento.

Injeção	Solução Padrão		
	T.R (min)	Área	Fator de Simetria (T)
1	4.36	15239202	1.31
2	4.35	15276468	1.32
3	4.36	15240718	1.33
4	4.36	15314001	1.34
5	4.36	15209056	1.31
6	4.36	15223955	1.32
<b>Média</b>	<b>4.36</b>	<b>15250566,67</b>	<b>1.32</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.09</b>	<b>0.25</b>	<b>0.88</b>

- *Conclusão*

O sistema cromatográfico demonstrou cumprir com os parâmetros que caracterizam a adequabilidade do sistema.

### 3.1.2.Especificidade

A especificidade deve ser comprovada relativamente a todos os potenciais interferentes do sistema. Deste modo de forma a confirmar a especificidade do método analítico para o ensaio de Doseamento foram injetadas as seguintes soluções: solução padrão, solução amostra, solução de placebo e solvente.

- *Crítérios de aceitação*

O ensaio é válido se, ao tempo de retenção do pico da substância ativa, não se verificar a presença de picos interferentes.

- *Resultados*

Os resultados obtidos para a Especificidade do método de Doseamento estão apresentados na tabela e figuras abaixo.

Tabela 3.3 Resultados da Especificidade para o ensaio de Doseamento.

No.	Nome	T.R. (min)	Figure
1	Solução padrão	4.66	Figura 3.1
2	Solução amostra	4.63	Figura 3.2
3	Solução de placebo	-	Figura 3.3
4	Solvente	-	Figura 3.4

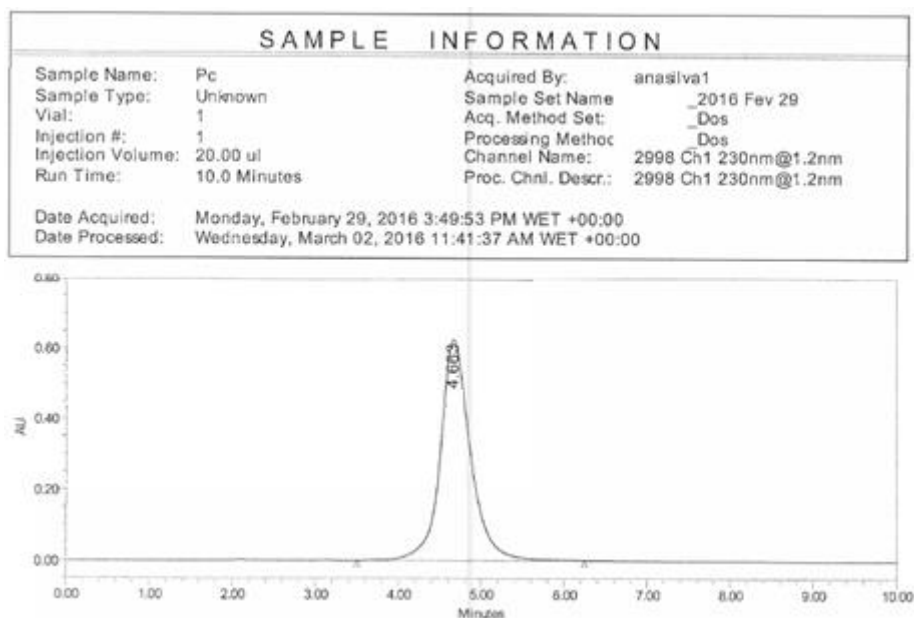


Figura 3.1 Cromatograma da Solução Padrão - Doseamento.

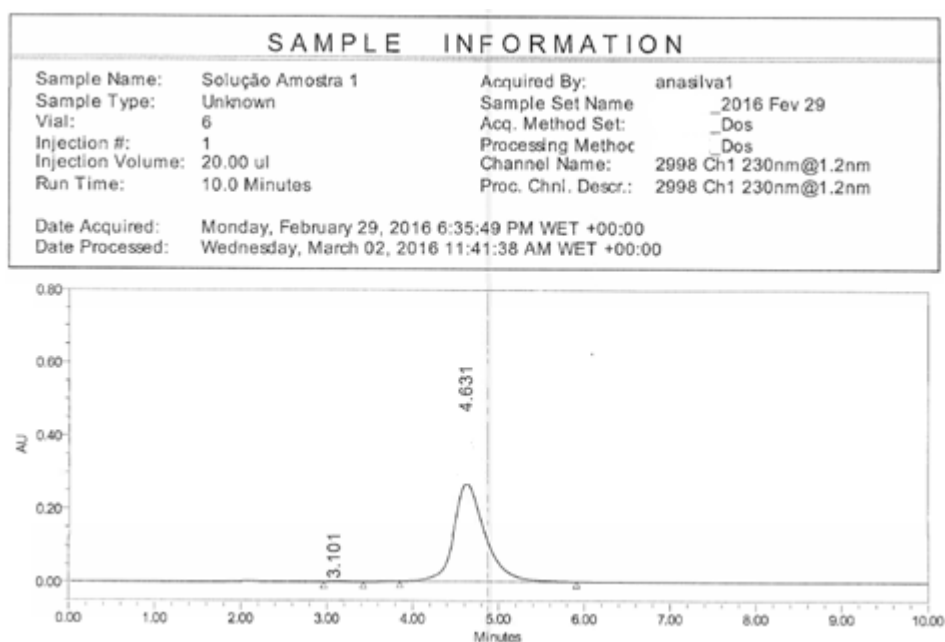


Figura 3.2 Cromatograma da Solução Amostra - Doseamento.

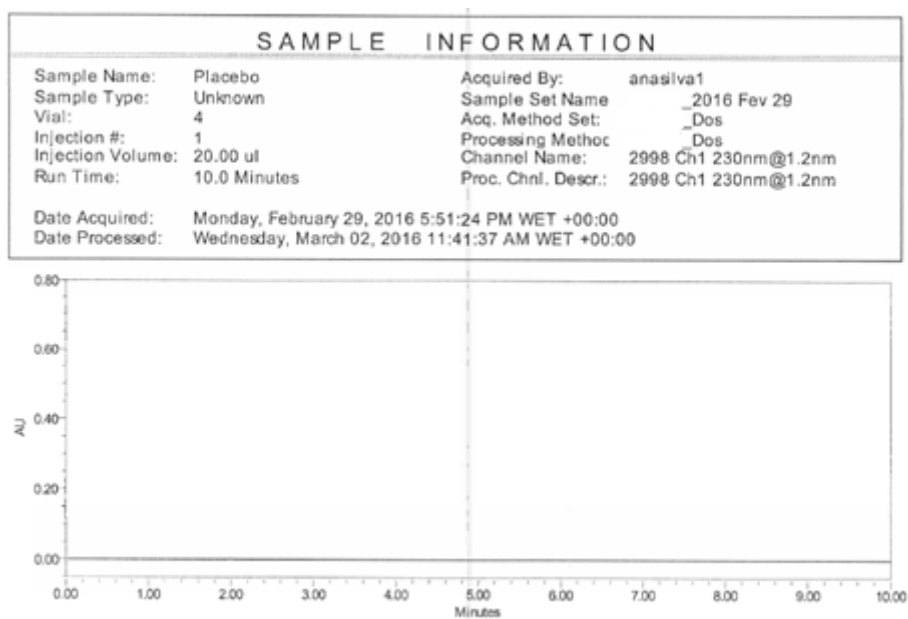


Figura 3.3 Cromatograma da Solução de Placebo - Doseamento.

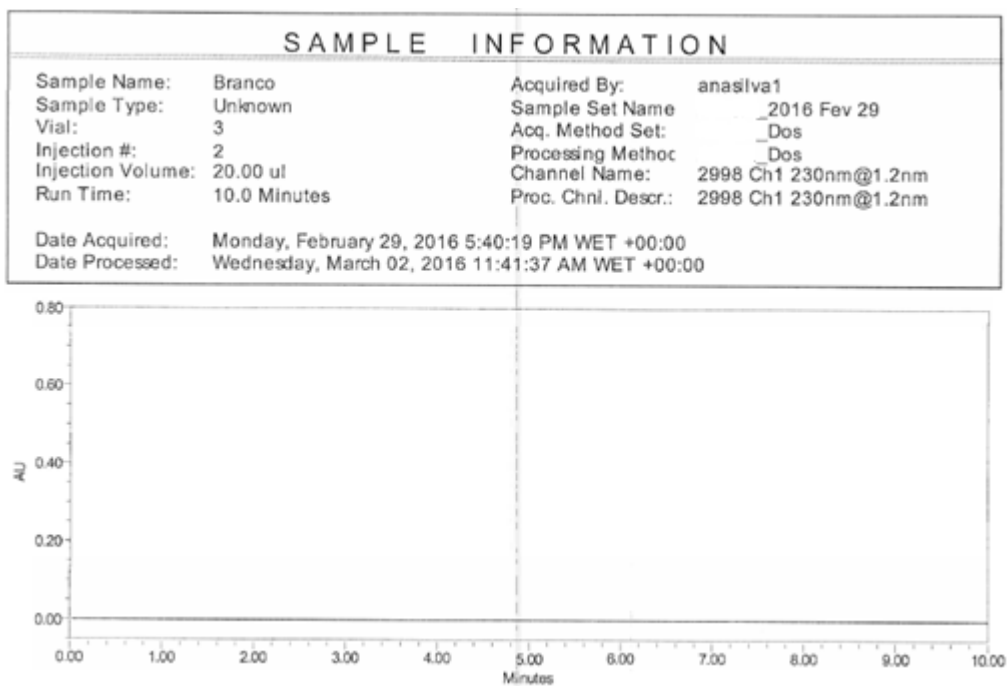


Figura 3.4 Cromatograma do Solvente – Doseamento.



- *Conclusão*

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas pode-se concluir que não há interferentes no tempo de retenção do pico principal, podendo-se concluir que o método é específico para o ensaio de Doseamento.

### 3.1.3. Repetibilidade do Sistema

A repetibilidade do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão de modo a se obter uma medida da variabilidade do sistema cromatográfico.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.4 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Ensaio para o método de Doseamento.

Tabela 3.4 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Doseamento.

Injeção	Solução Padrão	
	T.R (min)	Área
1	4.36	15239202
2	4.35	15276468
3	4.36	15240718
4	4.36	15314001
5	4.36	15209056
6	4.36	15223955
<b>Média</b>	<b>4.36</b>	<b>15250566.67</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.09</b>	<b>0.25</b>

- *Conclusão*

Pode-se concluir que os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação.

### 3.1.4. Repetibilidade do Ensaio

A repetibilidade do ensaio foi determinada pela análise consecutiva, contra padrão, de seis amostras preparadas ao nível de concentração 100%, de modo a se obter uma medida da variabilidade inerente a ensaio.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.5 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do ensaio.

Tabela 3.5 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio do Doseamento.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	100.07
2	99.91
3	100.04
4	100.25
5	100.16
6	100.89
<b>Média (%)</b>	<b>100.22</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.35</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.35</b>

- *Conclusão*

Pode-se verificar que os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação.

### 3.1.5. Precisão Intermédia

De modo a confirmar a precisão intermédia foram preparadas seis amostras ao nível de concentração de 100% por um segundo analista, num equipamento diferente e num dia diferente.

- *Crítérios de aceitação*

Para um total de seis determinações desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%;

Para o total de doze determinações desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.5%.

- *Resultados*

Na tabela 3.6 estão apresentados os resultados obtidos para a Precisão Intermédia do ensaio de Doseamento.

Tabela 3.6 Resultados da Precisão Intermédia do ensaio de Doseamento.

Amostra	Concentração (%)	
	Analista 1	Analista 2
1	100.07	100.35
2	99.91	99.99
3	100.04	99.96
4	100.25	100.19
5	100.16	100.27
6	100.89	100.31
<b>Média (%)</b>	100.22	100.18
<b>SD (%)</b>	0.35	0.17
<b>RSD (%)</b>	0.35	0.17
<b>Média (%)</b>	<b>100.20</b>	
<b>SD (%)</b>	<b>0.26</b>	
<b>RSD (%)</b>	<b>0.26</b>	

- *Conclusão*

Os resultados obtidos para a Precisão Intermédia do ensaio de Doseamento estão de acordo com os critérios de aceitação.

### 3.1.6.Exatidão

A exatidão foi determinada através da preparação de nove soluções de placebo fortificadas com ativo, tendo sido testada a três níveis de concentração (50%, 100% e 150% da concentração de trabalho). Foram preparados três replicados por cada nível tendo-se também preparado amostras de placebo de modo a avaliar o nível de interferência da matriz.

- *Critérios de aceitação*

A percentagem de recuperação do ativo deve encontrar-se entre 98%-102%.

- *Resultados*

Na tabela 3.7 estão apresentados os resultados obtidos para a exatidão do ensaio de Doseamento.

Tabela 3.7 Resultados da Exatidão do ensaio de Doseamento.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	100.05	100.10	99.67
	Amostra 2	100.45	99.74	99.91
	Amostra 3	98.79	100.05	99.69
9 Determinações				
Média (%)		99.80		
SD (%)		0.47		
RSD (%)		0.47		

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação para a exatidão.

### 3.1.7.Linearidade

Para o estudo da linearidade foram preparadas várias soluções padrão de concentração crescente, sendo cada solução injetada em triplicado. Utilizando-se o método dos desvios quadrados (regressão linear) obteve-se os parâmetros a avaliar.

- *Crítérios de aceitação*

Coefficiente de correlação (r) maior ou igual que 0.999;

Resíduos distribuídos aleatoriamente em torno do zero.

- *Resultados*

Na tabela 3.8 e nas figuras 3.5 e 3.6 estão apresentados os resultados obtidos para a Linearidade do Ensaio de Doseamento.

Tabela 3.8 Resultados da Linearidade do ensaio de Doseamento.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	204.03	3018123.67	0.17
2	502.22	7475837.00	0.21
3	800.41	11874888.67	0.13
4	894.57	13266225.00	0.04
5	1004.43	15511229.00	0.09
6	1098.60	16241464.67	0.11
7	1192.76	18059815.00	0.14
8	1569.43	23308506.00	0.19
<b>Interceção</b>		<b>-1270.490</b>	
<b>Declive</b>		<b>14968.299</b>	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>		<b>0.999</b>	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>		<b>0.999</b>	
<b>Limites de interceção no IC<sub>95</sub> %</b>		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-544950.872	542409.891

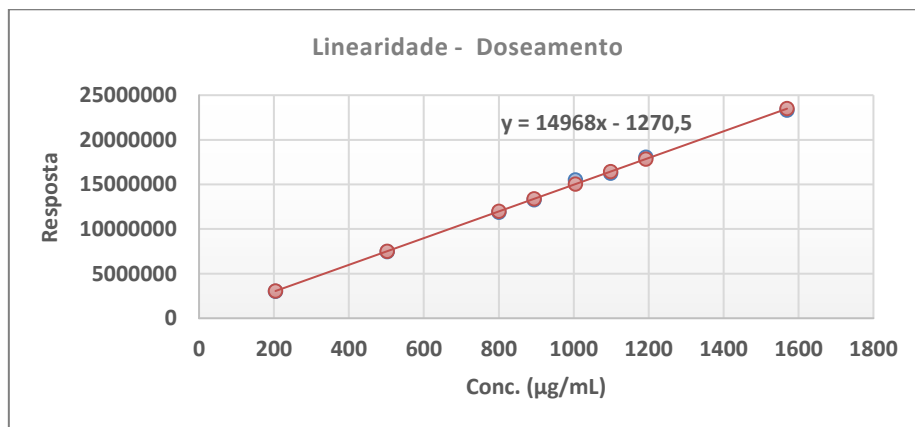


Figura 3.5 Recta da Regressão Linear - Doseamento.

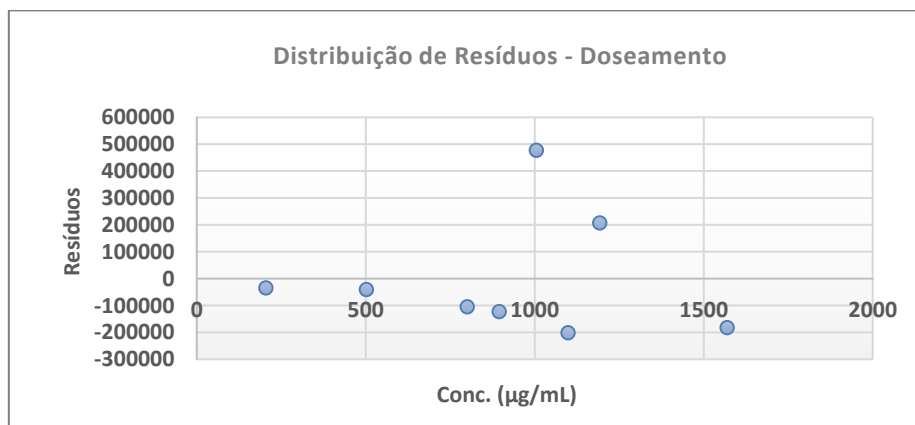


Figura 3.6 Distribuição de Resíduos - Doseamento.

- *Conclusão*

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas cumprindo os critérios de aceitação.

### 3.1.8. Robustez

A robustez do método de doseamento foi determinado pela preparação de três soluções de placebo fortificadas com princípio ativo, na proporção correspondente à fórmula do medicamento, que foram analisadas pelo método original e por métodos em que foram realizadas ligeiras alterações aos parâmetros do método original (fluxo, temperatura da coluna, composição da fase móvel).

- *Crítérios de aceitação*

Desvio em relação a resposta inicial inferior a 3.0 %.

- *Resultados*

Na tabela 3.9 estão apresentados os resultados obtidos para a Robustez do ensaio de Doseamento.

Tabela 3.9 Resultados da Robustez do ensaio de Doseamento.

Condições Alteradas	Concentração (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	S.D (%)	R.S.D (%)	IC <sub>95%</sub>
<b>Método Original</b>	100.07 99.91 100.04	100.01	0.09	0.09	99.75 – 100.27
<b>Fluxo (1.2 mL/min)</b>	100.06 99.92 100.02	100.00	0.07	0.07	99.78 – 100.22
<b>Fluxo (0.8 mL/min)</b>	100.55 100.32 100.33	100.40	0.13	0.13	100 – 100.8
<b>Temperatura da coluna (30 °C)</b>	100.01 100.06 100.19	100.09	0.09	0.09	99.8 – 100.37
<b>Composição da Fase Móvel (2:23)</b>	100.34 100.53 100.78	100.55	0.22	0.22	99.88 – 101.22
<b>Composição da Fase Móvel (0.5:24.5)</b>	100.09 100.04 100.17	100.10	0.07	0.07	99.9 – 100.3
<b>Média (%)</b>	<b>100.19</b>				
<b>S.D. (%)</b>	<b>0.24</b>				
<b>R.S.D. (%)</b>	<b>0.24</b>				

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas.

### 3.2. COMPOSTOS RELACIONADOS

No ensaio de compostos relacionados é pretendido quantificar as substâncias relacionadas (impurezas) da substância ativa presentes na amostra. Os compostos relacionados englobam as impurezas provenientes da substância ativa (impurezas de síntese), produtos de degradação da substância ativa e produtos de reação da substância ativa com um determinado excipiente e/ou com o material de acondicionamento primário.

A validação do ensaio de compostos relacionados foi efetuada, tendo em conta que a concentração de trabalho é de 1.44 µg/mL em substância activa.

- *Condições cromatográficas:*

Tabela 3.10 Condições cromatográficas para o ensaio de Compostos Relacionados.

<b>Coluna</b>	Lichrospher RP18 125x4.0mm, 5 µm		
<b>Fluxo</b>	1,5 ml/min		
<b>Volume de injeção</b>	10 µL		
<b>Fase Móvel</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Solução A (%)</b>	<b>Solução B (%)</b>
	0	97	3
	10	97	3
	22	75	25
	26	97	3
	30	97	3
<b>Temperatura da coluna</b>	40 °C		
<b>Temperatura das amostras</b>	4 °C		
<b>Detetor</b>	UV		
<b>Comprimento de onda (λ)</b>	210 nm		
<b>Tempo de corrida</b>	30 minutos		
<b>Solvente</b>	Solução A		

- *Preparação de soluções*

**Fase Móvel**

Solução A: 2.72 g/L de fosfato de potássio monobásico em água. Ajustar o pH para  $5.0 \pm 0.1$  com uma solução de hidróxido de potássio (1N).

Solução B: Metanol.

**Solução Resolução**

Pesar 5 mg de impureza A e 5 mg de impureza D e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Diluir com solução A. Transferir 5.0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20 mL e diluir com o mesmo solvente. Pipetar 2.5 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 10 mL e diluir com a solução A.

**Solução Padrão**

Pesar 28.7 mg de ativo e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Diluir com solução A. Transferir 5.0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e diluir com o mesmo solvente. Pipetar 1.0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20 mL e diluir com a solução A.  $C \approx 1.25 \mu\text{g/mL}$  (0.1%)

**Solução amostra**

Pesar 814.5 mg de produto acabado para um balão volumétrico de 500 mL. Juntar solução A até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com solução A e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.  $C \approx 1.25 \text{ mg/mL}$

Para o ensaio de Compostos Relacionados os parâmetros validados foram a adequabilidade do sistema, a especificidade, a repetibilidade do sistema, a repetibilidade do ensaio, a precisão intermédia, a exatidão, a linearidade, o limite de detecção e de quantificação e a robustez. Procedeu-se ainda ao cálculo dos fatores de resposta para as diversas impurezas conhecidas.

O método de compostos relacionados foi também avaliado, em conjunto com o método de Doseamento, quanto à sua adequabilidade como indicador de estabilidade.



### 3.2.1. Adequabilidade do Sistema

De modo a determinar a adequabilidade do sistema do método de Compostos Relacionados foi injetada uma solução padrão em sextuplicado e uma solução resolução em duplicado.

- *Crítérios de aceitação*

#### Solução Padrão

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 10.0%;

#### Solução Resolução

Resolução entre o pico da impureza A e o segundo pico da impureza D no mínimo 1.5.

- *Resultados*

Na tabela 3.11 estão apresentados os resultados obtidos para a Adequabilidade do Sistema do ensaio de Compostos Relacionados.

Tabela 3.11 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Compostos Relacionados.

Injeção	<i>Solução Resolução</i>	<i>Solução Padrão</i>	
	Resolução entre o pico da impureza A e o Segundo pico da impureza D	T.R (min)	Área
1	1.73	2.76	16665
2	1.73	2.75	16305
3	-	2.74	16473
4	-	2.75	16550
5	-	2.74	16344
6	-	2.75	16310
<b>Média</b>	<b>1.73</b>	<b>2.75</b>	<b>16441.17</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.00</b>	<b>0.27</b>	<b>0.89</b>

- *Conclusão*

O sistema cromatográfico demonstrou cumprir com os parâmetros que caracterizam a adequabilidade do sistema.

### 3.2.2.Especificidade

De modo a confirmar a especificidade do ensaio de Compostos Relacionados foram injetadas separadamente as seguintes soluções: Solução resolução, solução padrão, solução amostra de produto acabado, solução placebo, soluções individuais de cada impureza, solução amostra de produto acabado fortificada com as impurezas e solventes.

- *Critérios de aceitação*

Ausência de interferências por parte da substância ativa, dos componentes do placebo ou de quaisquer outros produtos de degradação.

- *Resultados*

Os resultados obtidos para a Especificidade do método de compostos relacionados estão apresentados na tabela e figuras abaixo.

Tabela 3.12 Resultados da Especificidade do ensaio de Compostos Relacionados.

No.	Nome	T.R. (min)	Figura
1	Solução Resolução	2.16 (Imp A) 1.45 (Imp D1) 1.90 (Imp D2)	Figura 3.7
2	Solução Padrão	2.75 (Activo)	Figura 3.8
3	Solução Amostra	2.77 (Activo) 2.16 (Imp A) 1.45 (Imp D1) 1.90 (Imp D2) 11.98 (Imp E1) 16.06 (Imp E2) 8.83 (Imp G) 0.80 (Imp I) 21.17 (Imp J)	Figura 3.9
4	Solução de Placebo	-	Figura 3.10
5	Impureza A	2.16 (Imp A)	Figura 3.11
6	Impureza B	2.33 (Imp B)	Figura 3.12
7	Impureza C	15.92 (Imp C)	Figura 3.13
8	Impureza D	1.45 (Imp D1) 1.90 (Imp D2)	Figura 3.14
9	Impureza D + E	1.45 (Imp D1) 1.90 (Imp D2) 12.00 (Imp E1) 16.09 (Imp E2)	Figura 3.15
10	Impureza F	16.94 (Imp F)	Figura 3.16
11	Impureza G	8.83 (Imp G)	Figura 3.17

12	Impureza I	0.80 (Imp I)	Figura 3.18
13	Impureza J	21.19 (Imp J)	Figura 3.19
14	Solução amostra fortificada com cada impureza	2.77 (Activo) 2.16 (Imp A) 2.33 (Imp B) 15.89 (Imp C) 1.45 (Imp D1) 1.90 (Imp D2) 11.97 (Imp E1) 16.94 (Imp F) 8.81 (Imp G) 0.80 (Imp I) 21.18 (Imp J)	Figura 3.20
15	Solução A	-	Figura 3.21
16	Solução B	-	Figura 3.22

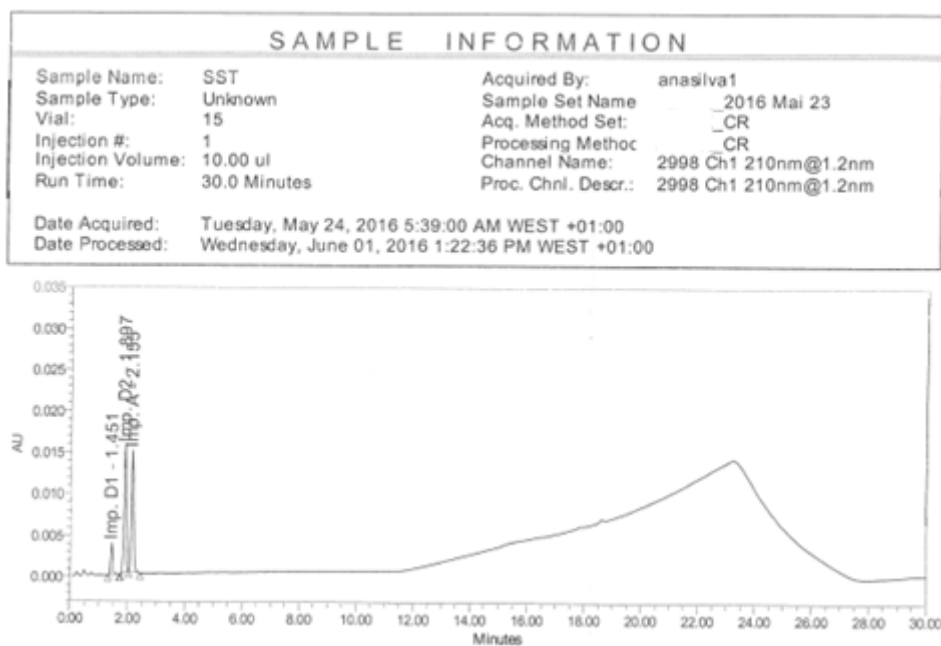


Figura 3.7 Cromatograma da Solução Resolução – Compostos Relacionados.

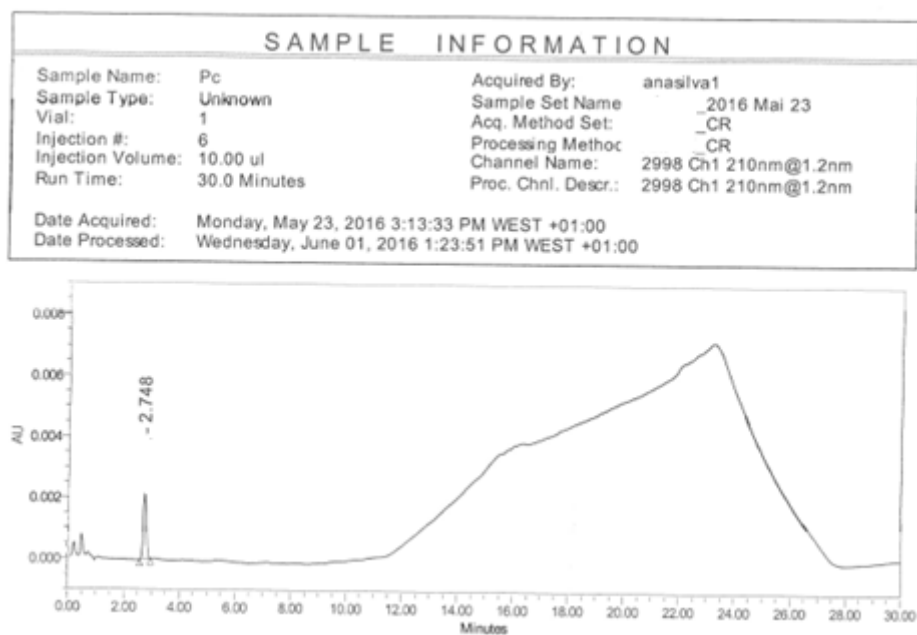


Figura 3.8 Cromatograma da Solução Padrão – Compostos Relacionados.

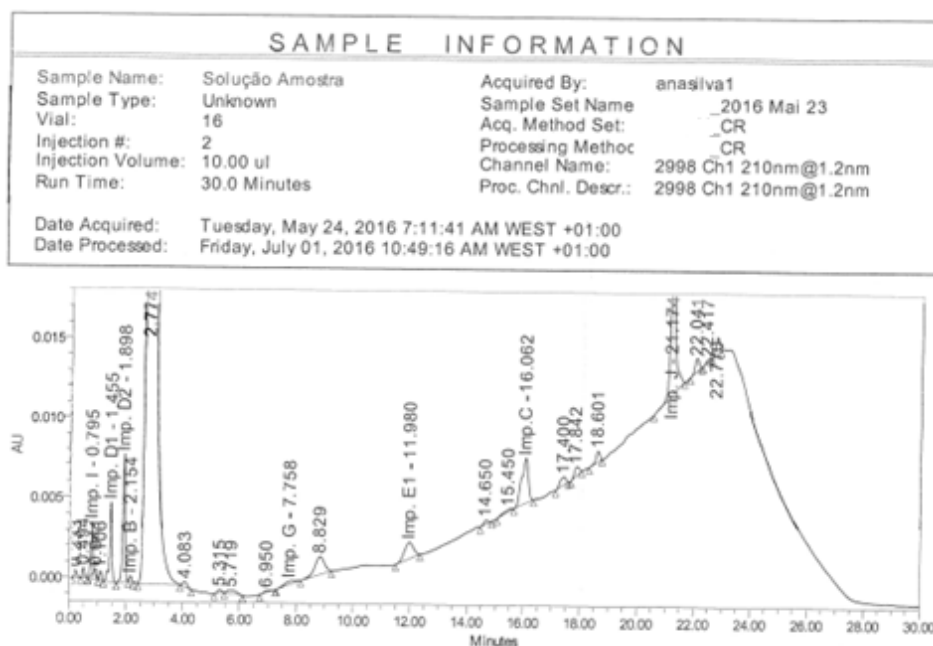


Figura 3.9 Cromatograma da Solução Amostra – Compostos Relacionados.

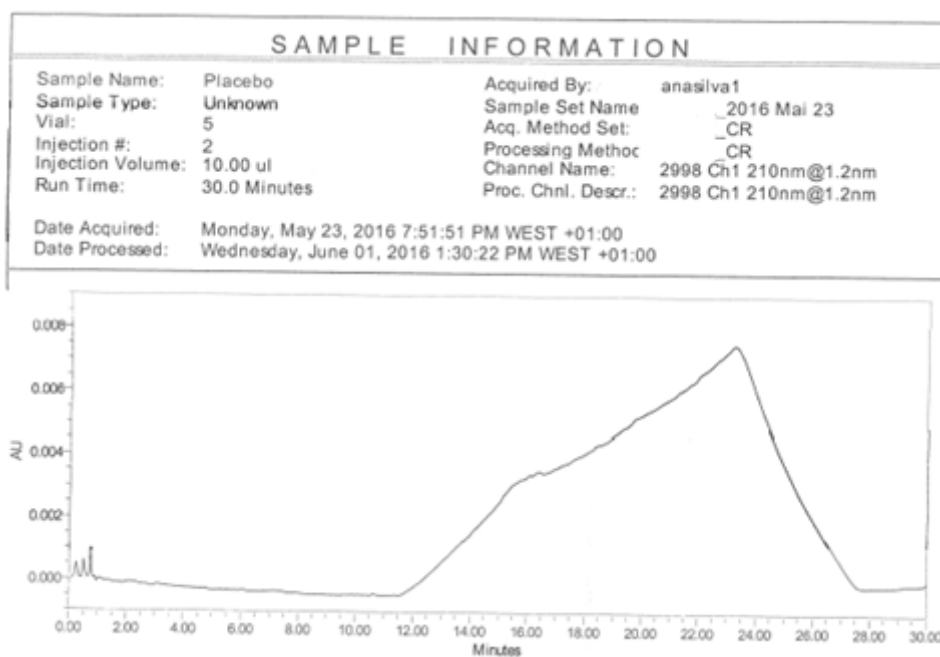


Figura 3.10 Cromatograma da Solução de Placebo – Compostos Relacionados.

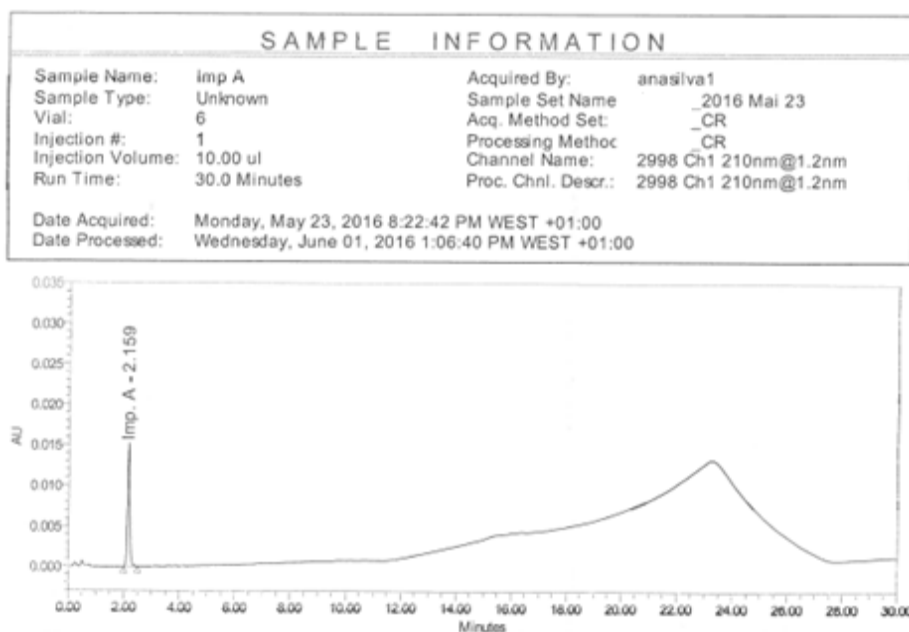


Figura 3.11 Cromatograma da Solução da Imp A – Compostos Relacionados.

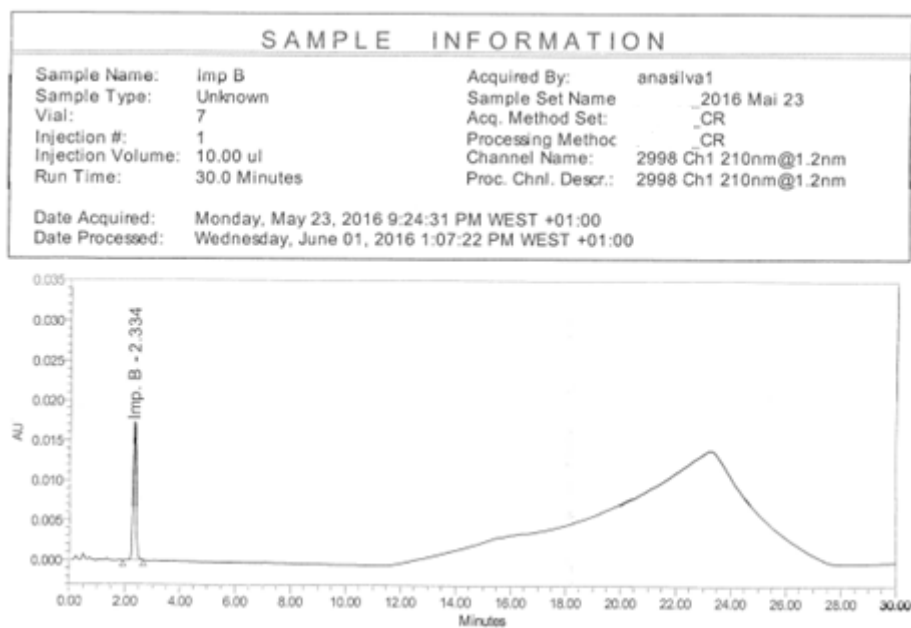


Figura 3.12 Cromatograma da Solução da Imp B – Compostos Relacionados.

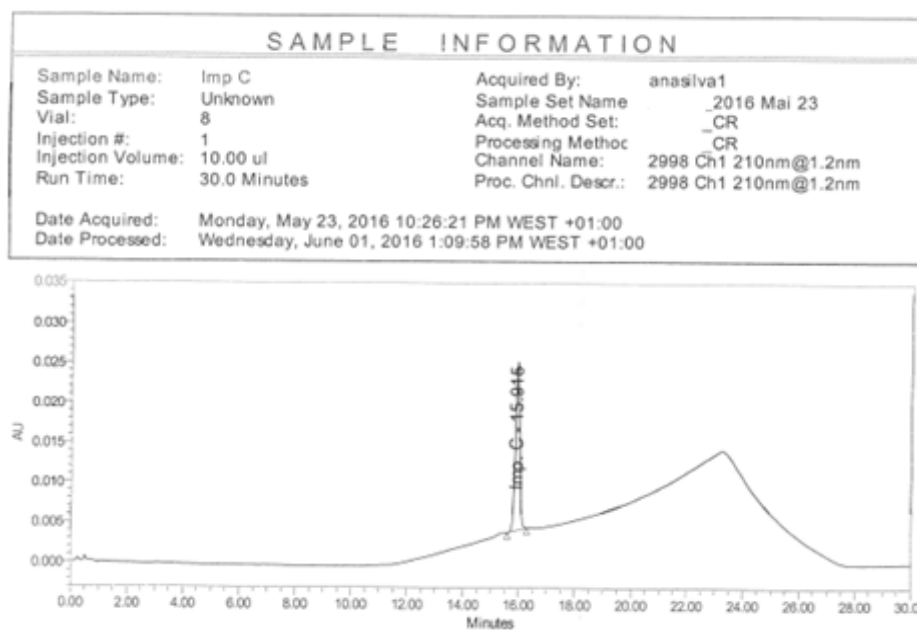


Figura 3.13 Cromatograma da Solução da Imp C – Compostos Relacionados.

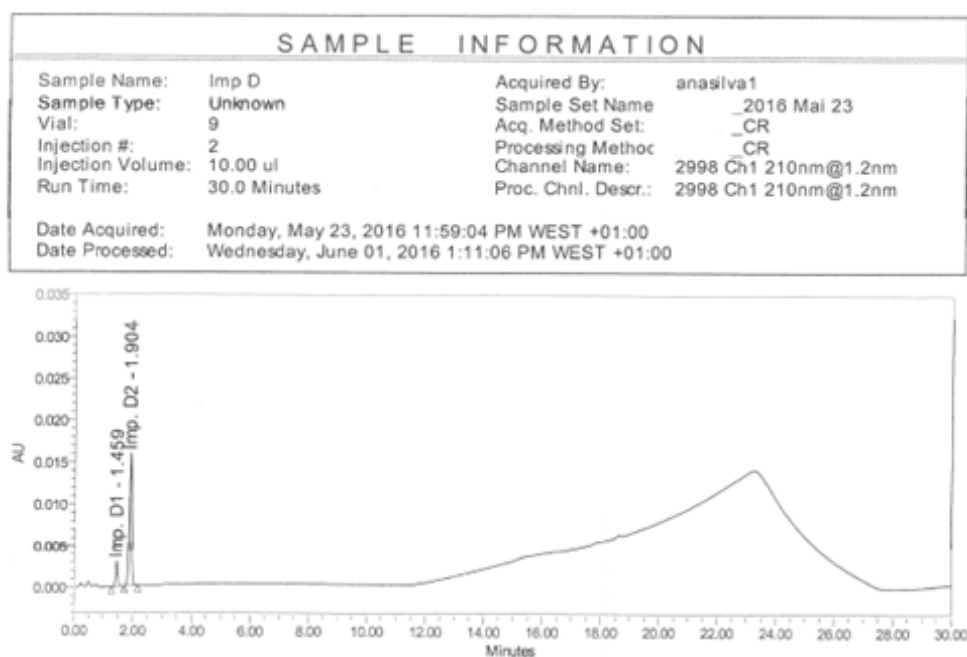


Figura 3.14 Cromatograma da Solução da Imp D – Compostos Relacionados.

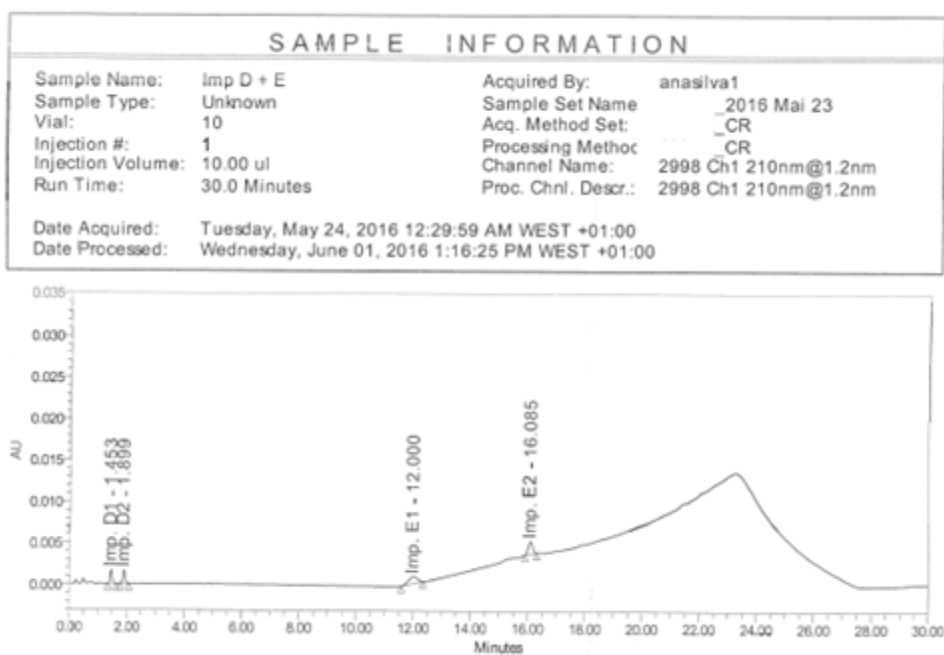


Figura 3.15 Cromatograma da Solução da Imp D + E – Compostos Relacionados.

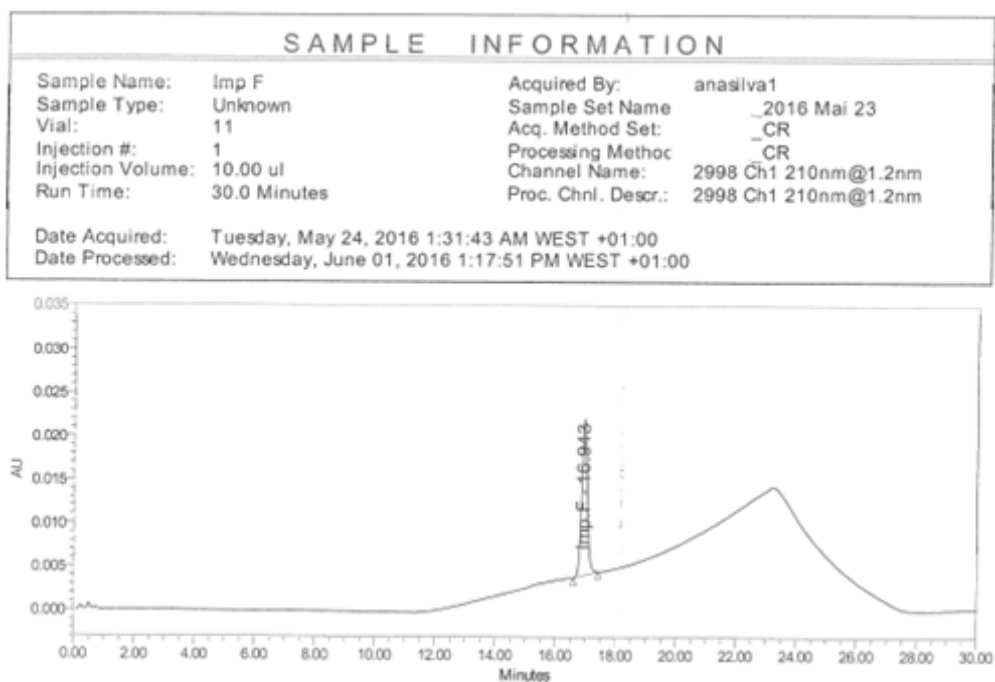


Figura 3.16 Cromatograma da Solução da Imp F – Compostos Relacionados.



SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Imp G	Acquired By:	anasilva1
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	_2016 Mai 23
Vial:	12	Acq. Method Set:	_CR
Injection #:	1	Processing Method:	CR
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Date Acquired:	Tuesday, May 24, 2016 2:33:33 AM WEST +01:00		
Date Processed:	Wednesday, June 01, 2016 1:18:41 PM WEST +01:00		

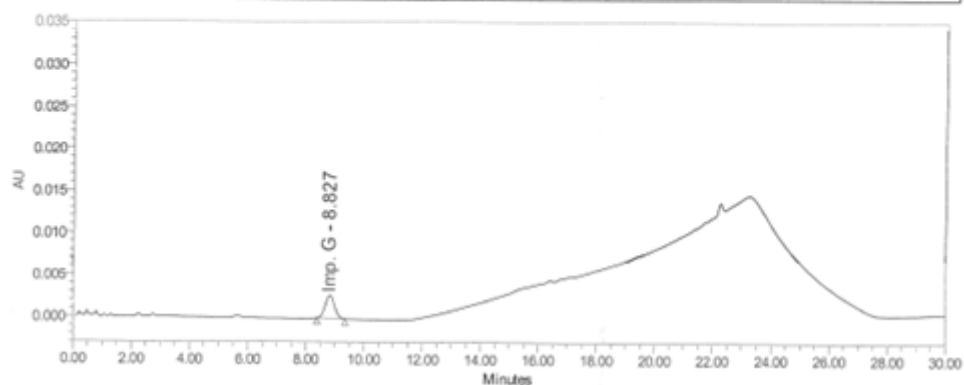


Figura 3.17 Cromatograma da Solução da Imp G – Compostos Relacionados.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Imp I	Acquired By:	anasilva1
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	_2016 Mai 23
Vial:	13	Acq. Method Set:	_CR
Injection #:	1	Processing Method:	CR
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Date Acquired:	Tuesday, May 24, 2016 3:35:22 AM WEST +01:00		
Date Processed:	Wednesday, June 01, 2016 1:19:53 PM WEST +01:00		

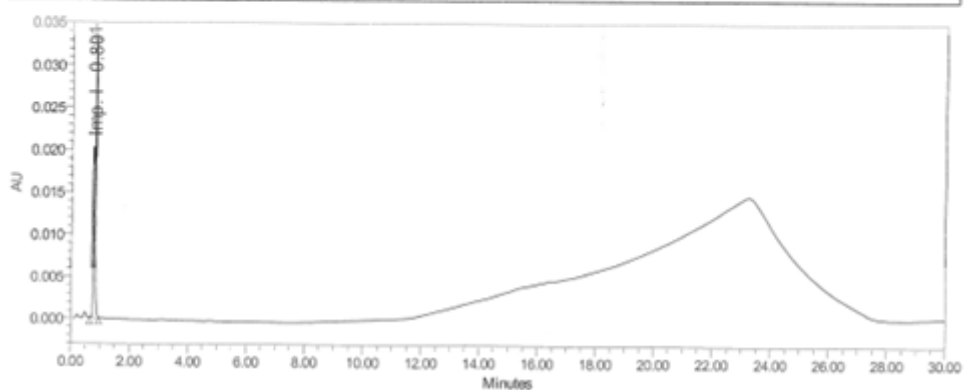


Figura 3.18 Cromatograma da Solução da Imp I – Compostos Relacionados.

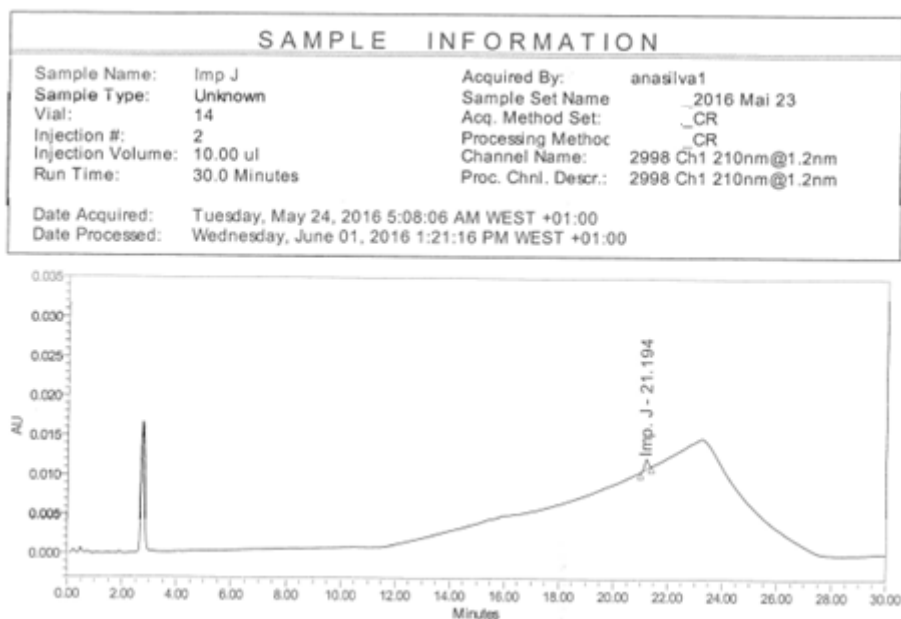


Figura 3.19 Cromatograma da Solução da Imp J – Compostos Relacionados.

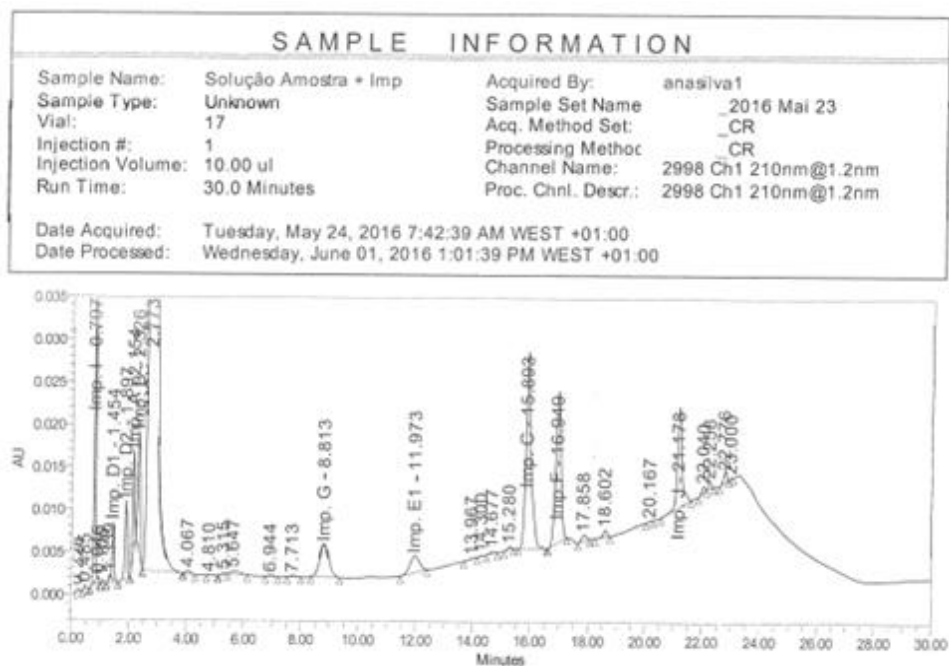


Figura 3.20 Cromatograma da Solução Amostra fortificada com cada impureza – Compostos Relacionados.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Fase Móvel A	Acquired By:	anasilva1
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	2016 Mai 23
Vial:	3	Acq. Method Set:	CR
Injection #:	1	Processing Method:	CR
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Date Acquired:	Monday, May 23, 2016 5:17:19 PM WEST +01:00		
Date Processed:	Wednesday, June 01, 2016 1:27:25 PM WEST +01:00		

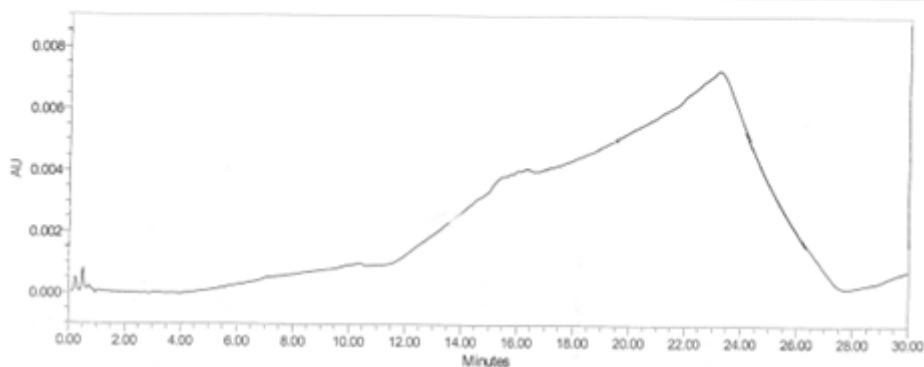


Figura 3.21 Cromatograma da Solução A – Compostos Relacionados.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Fase Móvel B	Acquired By:	anasilva1
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	2016 Mai 23
Vial:	4	Acq. Method Set:	CR
Injection #:	1	Processing Method:	CR
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 210nm@1.2nm
Date Acquired:	Monday, May 23, 2016 6:19:16 PM WEST +01:00		
Date Processed:	Tuesday, May 24, 2016 12:48:16 PM WEST +01:00		

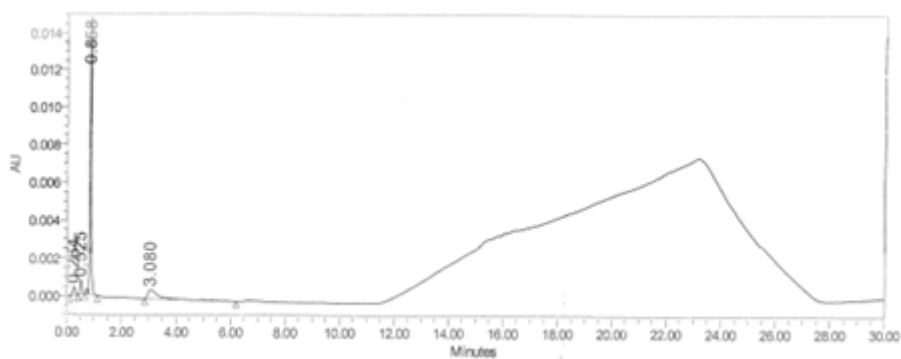


Figura 3.22 Cromatograma da Solução B – Compostos Relacionados.

#### - Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas foi verificado que não existe nenhuma interferência por parte da substância ativa, dos componentes do placebo ou de quaisquer

outros produtos de degradação, pelo que o método de quantificação de compostos relacionados é específico.

### 3.2.3.Repetibilidade do Sistema

A repetibilidade do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão.

- *CrITÉRIOS de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 10.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.13 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema.

Tabela 3.13 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Compostos Relacionados

<b>Injeção</b>	<b>Solução Padrão</b>	
	<b>T.R (min)</b>	<b>Área</b>
1	2.76	16665
2	2.75	16305
3	2.74	16473
4	2.75	16550
5	2.74	16344
6	2.75	16310
<b>Média</b>	<b>2.75</b>	<b>16441.17</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.27</b>	<b>0.89</b>

- *Conclusão*

Os resultados obtidos da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Compostos Relacionados estão dentro dos critérios de aceitação.

### 3.2.4.Repetibilidade do Ensaio

A repetibilidade do ensaio para as impurezas conhecidas foi confirmada pela preparação de seis amostras de produto acabado fortificada com cada uma das impurezas conhecidas na concentração correspondente ao seu limite de especificação.

Foi ainda determinada a Repetibilidade do Ensaio para a quantificação da substância ativa numa solução preparada à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%) e à concentração de especificação das impurezas conhecidas (1.0%).

- *Critérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 10.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.14 estão apresentados todos os resultados obtidos para a Repetibilidade do Ensaio.

Tabela 3.14 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio de Compostos Relacionados.

<b>Amostra</b>	<b>Ativo (0.1%)</b>	<b>Ativo (1.0%)</b>	<b>Imp A (1.0 %)</b>	<b>Imp B (1.0 %)</b>	<b>Imp C (1.0 %)</b>	<b>Imp D (1.0 %)</b>	<b>Imp F (1.0 %)</b>	<b>Imp G (1.0 %)</b>	<b>Imp I (1.0 %)</b>
1	97.14	98.68	99.15	94.21	87.02	89.15	101.85	102.03	101.81
2	99.39	97.87	99.63	94.17	87.12	89.46	102.21	103.34	101.42
3	98.55	99.34	99.70	91.79	87.23	90.19	101.86	103.24	100.57
4	97.51	98.71	101.4	93.52	89.17	91.07	102.86	103.89	100.6
5	99.03	98.51	101.21	95.16	88.17	91.68	102.41	103.94	101.38
6	99.56	98.60	100.67	92.70	88.33	92.40	101.93	103.56	100.47
<b>Recuperação (%)</b>	<b>98.53</b>	<b>98.62</b>	<b>100.29</b>	<b>93.59</b>	<b>87.84</b>	<b>90.66</b>	<b>102.19</b>	<b>103.33</b>	<b>101.04</b>
<b>SD (%)</b>	<b>1.00</b>	<b>0.47</b>	<b>0.93</b>	<b>1.20</b>	<b>0.86</b>	<b>1.28</b>	<b>0.40</b>	<b>0.70</b>	<b>0.56</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1.02</b>	<b>0.48</b>	<b>0.93</b>	<b>1.28</b>	<b>0.98</b>	<b>1.41</b>	<b>0.39</b>	<b>0.68</b>	<b>0.56</b>

- *Conclusão*

Todos os resultados obtidos cumprem com os critérios de aceitação.

### 3.2.5.Precisão Intermédia

De modo a confirmar a precisão intermédia do ensaio de Compostos Relacionados foram preparados dois conjuntos de amostras por analistas diferentes, em equipamentos diferentes e em dias diferentes. As amostras foram preparadas à concentração de especificação das impurezas conhecidas (1.0%) e à das impurezas desconhecidas (0.1%).

- *Crêterios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) entre seis determinações inferior ou igual a 10.0%, e entre as doze determinações inferior ou igual a 15.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.15 são apresentados os resultados obtidos para a precisão intermédia do ensaio de Compostos Relacionados pelos dois analistas.

Tabela 3.15 Resultados da Precisão Intermédia para o ensaio de Compostos Relacionados.

Amostra	Ativo (0.1 %)		Ativo (1.0 %)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	97.1	97.3	98.70	102.80
2	99.4	97.4	97.90	102.40
3	98.6	97.5	99.30	102.70
4	97.5	97.7	98.70	102.70
5	99.0	97.3	98.50	102.40
6	99.6	96.9	98.60	102.40
<b>Média (%)</b>	98.53	97.34	98.62	102.55
<b>SD (%)</b>	1.00	0.29	0.47	0.20
<b>RSD (%)</b>	1.02	0.29	0.48	0.20
<b>Média (%)</b>	<b>97.94</b>		<b>100.59</b>	
<b>SD (%)</b>	<b>0.94</b>		<b>2.08</b>	
<b>RSD (%)</b>	<b>0.96</b>		<b>2.07</b>	

- *Conclusão*

Os resultados obtidos para a precisão intermédia cumprem os critérios de aceitação.

### 3.2.6.Exactidão

A exatidão para as impurezas conhecidas foi determinada pela preparação de doze soluções de produto acabado fortificada com cada impureza conhecida a três níveis (50%, 100 e 150%). Foram ainda preparadas doze soluções de placebo fortificadas com ativo   concentração das impurezas conhecidas (1.0%) e mais doze   concentração das impurezas desconhecidas (0.1%) de modo a estudar a exatidão do ativo às duas concentrações de trabalho.

- *Crêterios de aceitação*

A percentagem de recuperação de cada impureza deve encontrar-se entre 90% - 110%, exceto para o nível de concentração mais baixo (50%) em que a percentagem de recuperação poderá encontrar-se entre 85% - 115%.

- *Resultados*

Os resultados obtidos para a exatidão das impurezas e do ativo às duas concentrações estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 3.16 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo   concentração das impurezas desconhecidas (0.1%).

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	92.39	97.14	98.21
	Amostra 2	92.08	99.39	98.41
	Amostra 3	91.86	98.55	98.82
	Amostra 4	-	97.51	-
	Amostra 5	-	99.03	-
	Amostra 6	-	99.56	-
12 Determinações				
Média (%)		96.91		
SD (%)		2.98		
RSD (%)		3.07		

Tabela 3.17 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo   concentração das impurezas conhecidas (1%).

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	99.21	98.68	98.91
	Amostra 2	99.05	97.87	98.44
	Amostra 3	99.03	99.34	99.09
	Amostra 4	-	98.71	-
	Amostra 5	-	98.51	-
	Amostra 6	-	98.60	-
12 Determinações				
Média (%)		98.79		
SD (%)		0.40		
RSD (%)		0.41		

Tabela 3.18 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza A.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	100.09	99.15	104.40
	Amostra 2	98.57	99.63	104.74
	Amostra 3	99.15	99.70	103.98
	Amostra 4	-	101.40	-
	Amostra 5	-	101.21	-
	Amostra 6	-	100.67	-
12 Determinações				
Média (%)		101.06		
SD (%)		2.17		
RSD (%)		2.15		

Tabela 3.19 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza B.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	92.24	94.21	92.96
	Amostra 2	89.72	94.17	92.53
	Amostra 3	89.35	91.79	92.13
	Amostra 4	-	93.52	-
	Amostra 5	-	95.16	-
	Amostra 6	-	92.70	-
12 Determinações				
Média (%)		92.54		
SD (%)		1.72		
RSD (%)		1.85		

Tabela 3.20 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza C.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	84.71	87.02	89.94
	Amostra 2	84.59	87.12	89.82
	Amostra 3	84.21	87.23	89.29
	Amostra 4	-	89.17	-
	Amostra 5	-	88.17	-
	Amostra 6	-	88.33	-
12 Determinações				
Média (%)		87.47		
SD (%)		2.07		
RSD (%)		2.36		



Tabela 3.21 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza D.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	95.37	89.15	95.24
	Amostra 2	95.86	89.46	95.55
	Amostra 3	98.49	90.19	97.09
	Amostra 4	-	91.07	-
	Amostra 5	-	91.68	-
	Amostra 6	-	92.40	-
12 Determinações				
Média (%)		93.46		
SD (%)		3.17		
RSD (%)		3.39		

Tabela 3.22 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza F.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	103.04	101.85	98.70
	Amostra 2	102.78	102.21	98.78
	Amostra 3	101.97	101.86	98.60
	Amostra 4	-	102.86	-
	Amostra 5	-	102.41	-
	Amostra 6	-	101.93	-
12 Determinações				
Média (%)		101.41		
SD (%)		1.69		
RSD (%)		1.67		

Tabela 3.23 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza G.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	98.58	102.03	103.74
	Amostra 2	101.87	103.34	104.78
	Amostra 3	98.90	103.24	105.10
	Amostra 4	-	103.89	-
	Amostra 5	-	103.94	-
	Amostra 6	-	103.56	-
12 Determinações				
Média (%)		102.75		
SD (%)		2.09		
RSD (%)		2.03		

Tabela 3.24 Resultados da Exatidão do ensaio de Compostos Relacionados – Impureza I.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	Amostra 1	105.79	101.81	99.05
	Amostra 2	98.44	101.42	98.72
	Amostra 3	102.12	100.57	99.82
	Amostra 4	-	100.60	-
	Amostra 5	-	101.38	-
	Amostra 6	-	100.47	-
12 Determinações				
Média (%)		100.85		
SD (%)		1.96		
RSD (%)		1.95		

- Conclusão

Os resultados obtidos para a exatidão cumprem os critérios de aceitação, exceto para a impureza C onde se pode observar um desvio relativamente aos valores teóricos de recuperação tendo-se aplicado um fator de correção (tabela abaixo apresentada).

Tabela 3.25 Factor de Correção para as impurezas.

Exatidão – Fator de Correção							
Imp A	Imp B	Imp C	Imp D	Imp F	Imp G	Imp I	Impurezas Desconhecidas
1.0000	1.0000	0.8747	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

### 3.2.7.Linearidade

Para o estudo da linearidade do ensaio de Compostos Relacionados foram preparadas várias soluções de concentração crescente, sendo cada solução injetada em triplicado. De modo a obter os parâmetros a avaliar foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear).

- Critérios de aceitação

Coefficiente de correlação (r) maior ou igual do que 0.99;

Resíduos distribuídos aleatoriamente em torno do zero.

- *Resultados*

Os resultados obtidos para a linearidade do ensaio de Compostos Relacionados estão apresentados nas tabelas e gráfico abaixo.

Tabela 3.26 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%).

<b>Solução</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Média</b>	<b>RSD (%)</b>
1	0.25	2614.67	2.01
2	0.63	7029.67	0.65
3	1.00	11780.33	1.06
4	1.13	13324.67	0.63
5	1.25	14500.67	0.51
6	1.38	15816.00	0.87
7	1.50	17151.67	0.65
8	1.88	21758.67	0.59
<b>Interceção</b>		<b>-187.80</b>	
<b>Declive</b>		<b>11695.27</b>	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>		<b>0.999</b>	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>		<b>0.999</b>	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-658.03	282.43

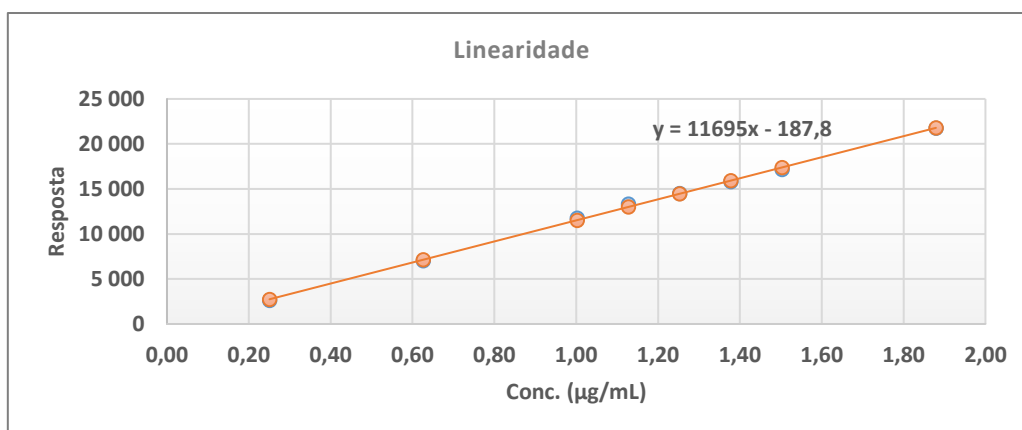


Figura 3.23 Recta da Regressão Linear – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%).

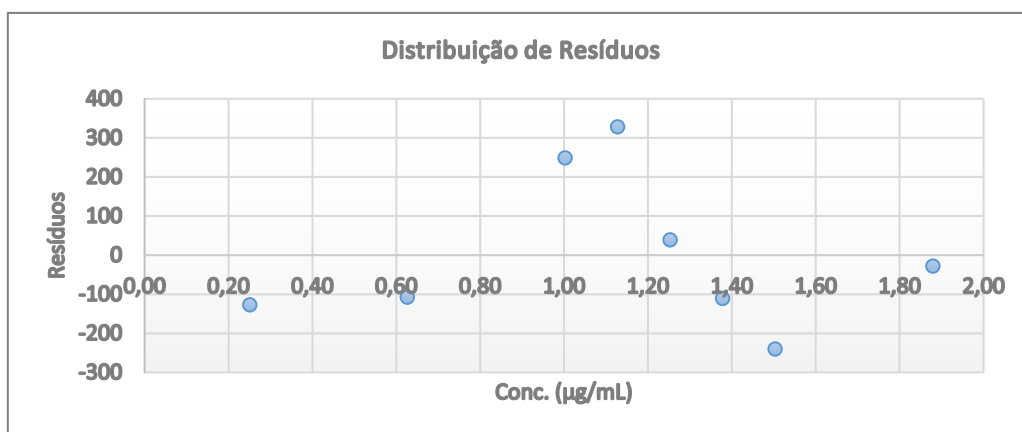


Figura 3.24 Distribuição de Resíduos – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%).

Tabela 3.27 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%).

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	2.51	29226.33	0.29
2	6.26	76879.33	0.26
3	10.02	122783.67	0.65
4	11.27	138803.33	0.34
5	12.53	153975.00	0.13
6	13.78	168654.67	0.25
7	15.03	185917.67	0.44
8	18.79	231324.67	0.60
9	25.05	309086.00	0.27
Interceção		-1289.07	
Declive		12393.53	
Coeficiente de Correlação (r)		0.999	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		0.999	
Limites de Interceção no IC 95%		Inferior	Superior
		-2326.54	-251.60

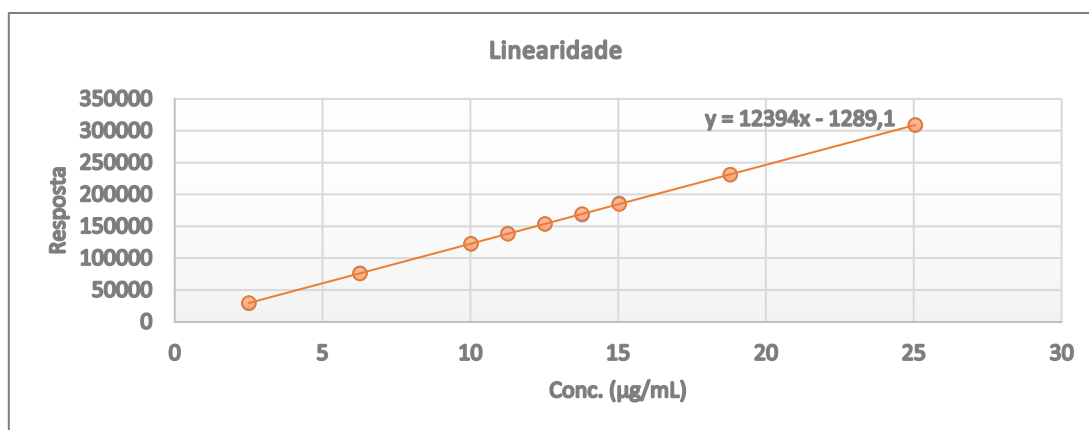


Figura 3.25 Recta da Regressão Linear – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%).

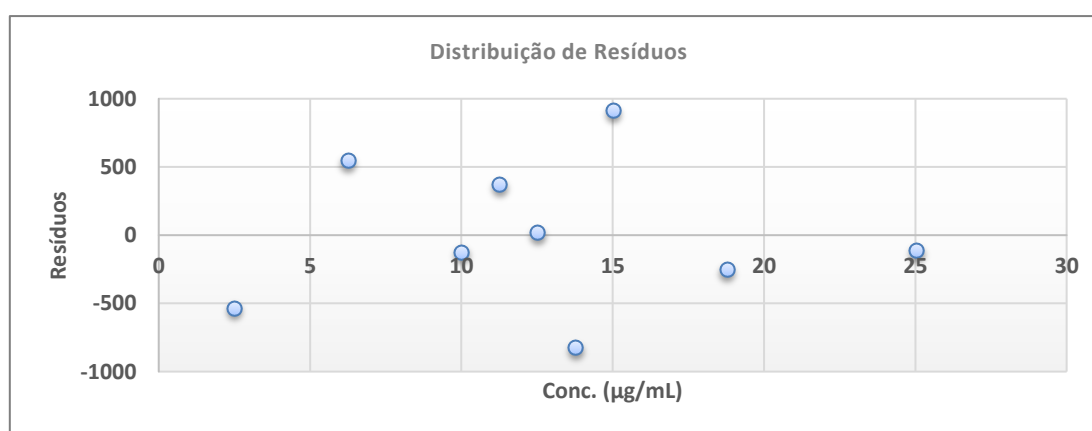


Figura 3.26 Distribuição de Resíduos – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%).

Tabela 3.28 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp A.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.23	7690.67	1.01
2	2.46	15310.00	2.26
3	6.14	40222.33	0.66
4	9.84	63023.67	0.32
5	11.06	71373.00	0.66
6	12.30	79087.33	0.41
7	13.54	86823.00	0.14
8	14.76	94968.00	0.33
9	18.46	118540.67	0.26
10	24.60	161225.33	0.09
Interceção		<b>-780.62</b>	
Declive		<b>6522.16</b>	
Coeficiente de Correlação (r)		<b>0.999</b>	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		<b>0.999</b>	
Limites de Interceção no IC 95%		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-1997.90	436.66

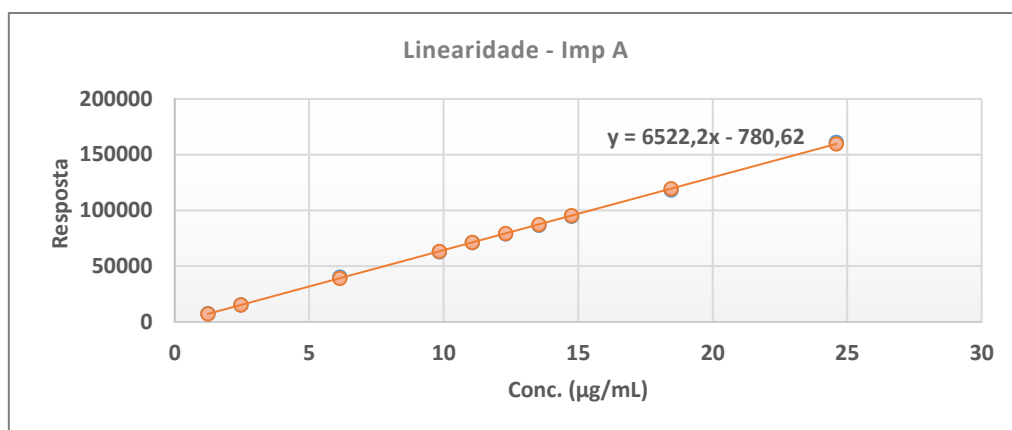


Figura 3.27 Recta da Regressão Linear – Imp A.

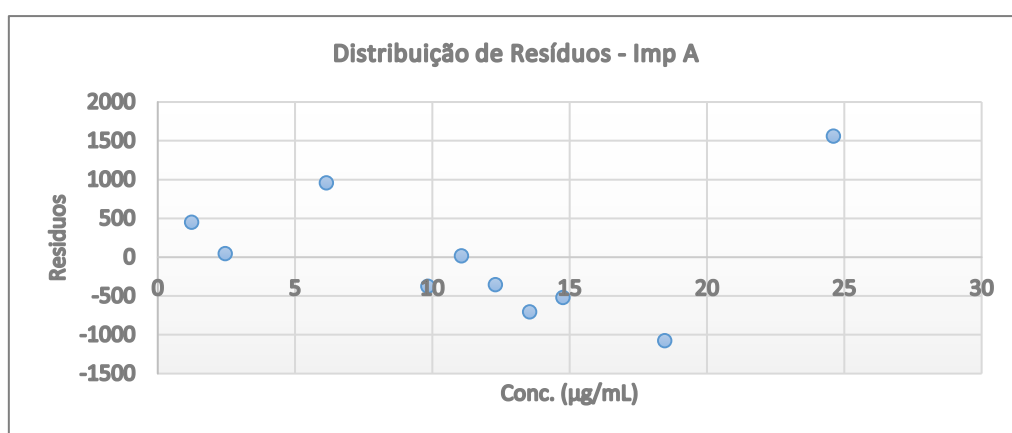


Figura 3.28 Distribuição de Resíduos – Imp A.

Tabela 3.29 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp B.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.24	8617.00	0.34
2	2.48	16920.67	0.82
3	6.19	41443.33	0.61
4	9.92	67335.67	0.18
5	11.15	76068.00	0.31
6	12.40	82023.00	0.63
7	13.65	92533.00	0.54
8	14.88	100131.67	0.82
9	18.61	125755.33	0.26
10	24.80	167201.33	0.63
Interceção		126.28	
Declive		6735.75	
Coeficiente de Correlação (r)		0.999	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		0.999	
Limites de Interceção no IC 95%		Inferior	Superior
		-891.04	1143.60

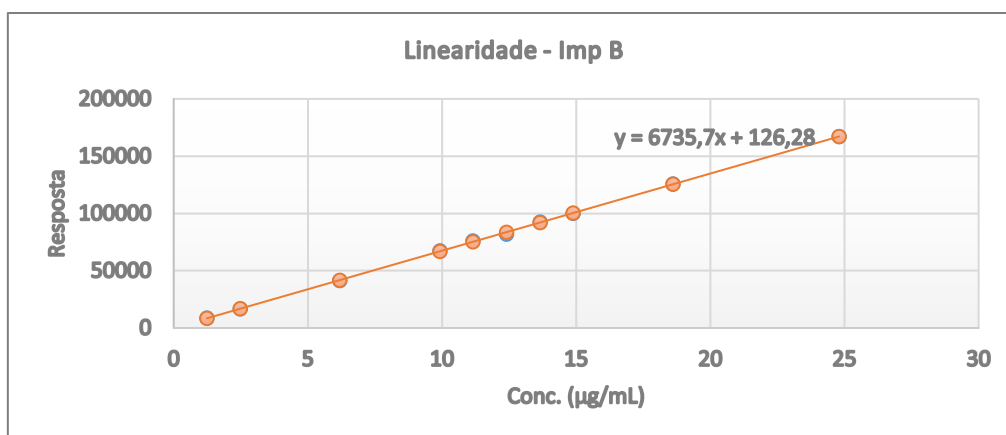


Figura 3.29 Recta da Regressão Linear – Imp B.

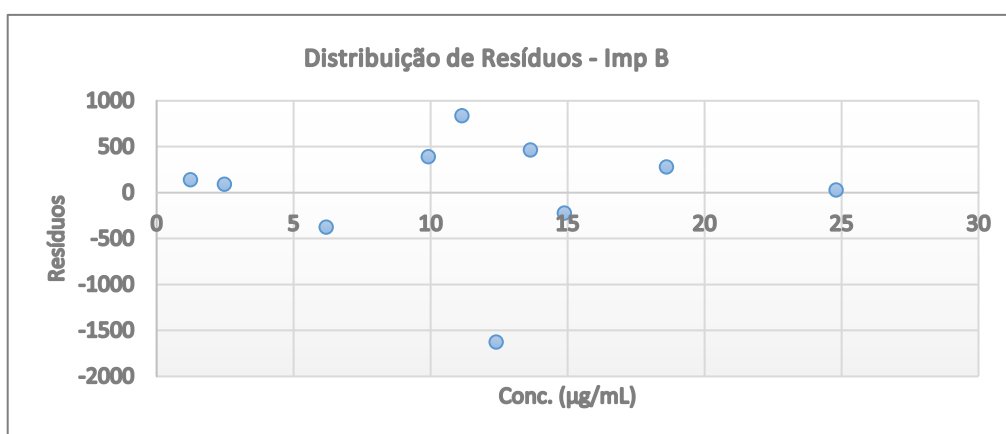


Figura 3.30 Distribuição de Resíduos – Imp B.

Tabela 3.30 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp C.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.30	21341.00	6.49
2	2.61	46791.33	0.68
3	6.50	116331.33	0.67
4	10.42	187510.67	0.39
5	11.71	211295.67	0.18
6	13.03	235127.67	0.17
7	14.34	257318.33	0.09
8	15.63	281788.00	0.58
9	19.55	354478.33	0.15
10	26.05	471516.67	0.17
Interceção		<b>-1684.61</b>	
Declive		<b>18164.78</b>	
Coeficiente de Correlação (r)		<b>0.999</b>	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		<b>0.999</b>	
Limites de Interceção no IC 95%		Inferior	Superior
		-2853.48	-515.74

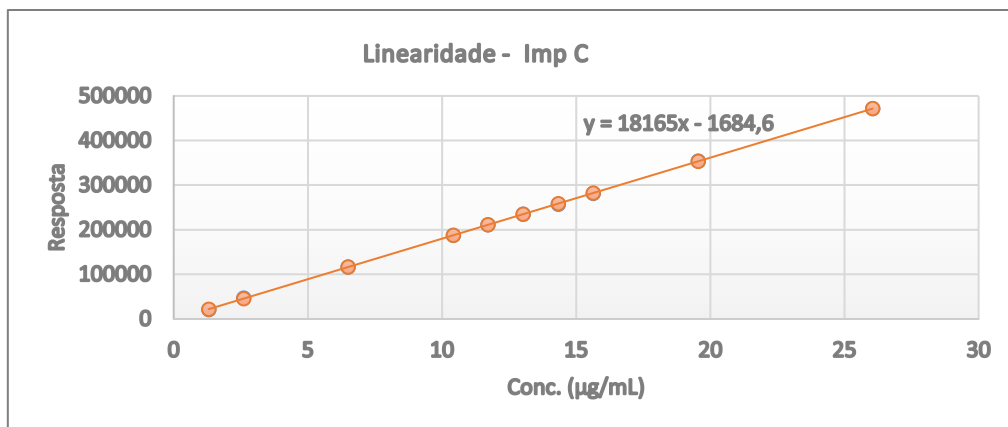


Figura 3.31 Recta da Regressão Linear – Imp C

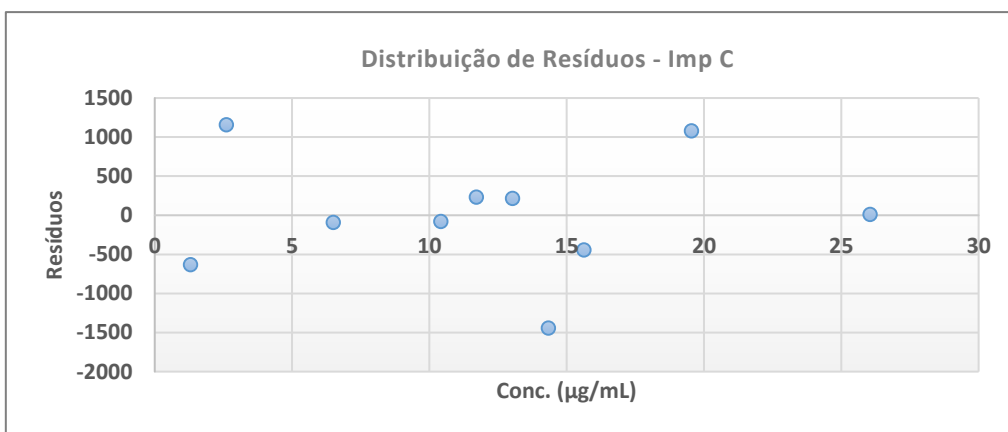


Figura 3.32 Distribuição de Resíduos – Imp C.

Tabela 3.31 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp D.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.22	9479.00	0.29
2	2.44	18883.67	2.12
3	6.09	48186.00	0.54
4	9.76	77413.67	0.08
5	10.97	87459.00	0.68
6	12.20	97295.33	0.22
7	13.43	106403.00	0.05
8	14.64	116463.00	0.07
9	18.31	145814.33	0.20
10	24.40	199139.33	0.24
Interceção		<b>-1503.45</b>	
Declive		<b>8122.43</b>	
Coeficiente de Correlação (r)		<b>0.999</b>	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		<b>0.999</b>	
Limites de Interceção no IC 95%		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-3265.02	258.12



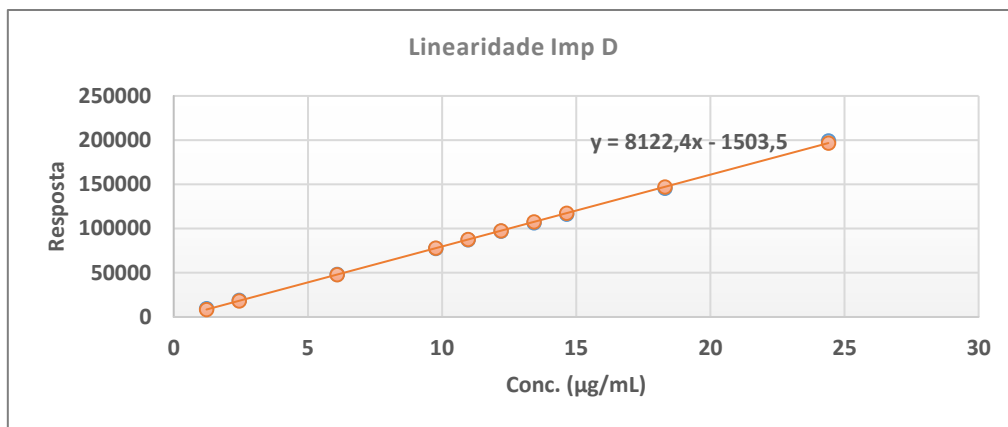


Figura 3.33 Recta da Regressão Linear – Imp D.

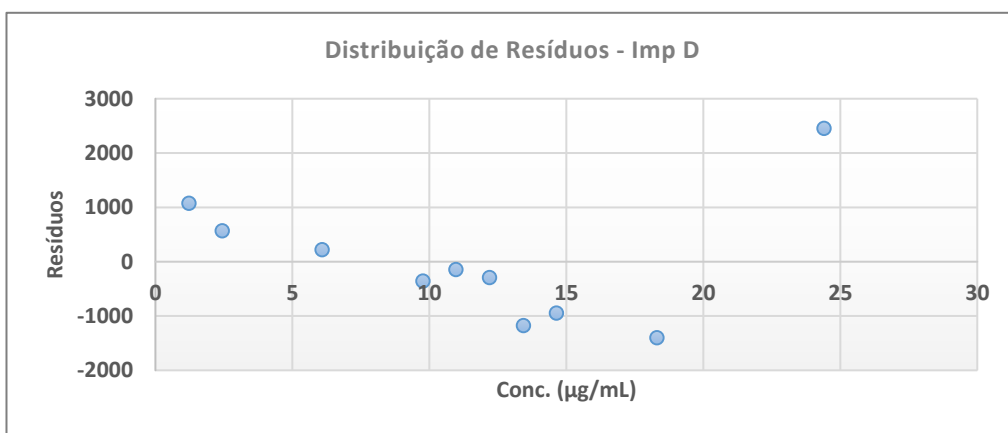


Figura 3.34 Distribuição de Resíduos – Imp D.

Tabela 3.32 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp F.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.27	21818.33	1.95
2	2.53	44785.67	1.86
3	6.31	115142.00	0.48
4	10.12	185147.67	1.77
5	11.37	209575.33	0.22
6	12.65	233432.67	0.55
7	13.93	257320.33	0.45
8	15.18	281057.67	0.04
9	18.99	357058.33	0.54
10	25.30	477871.33	0.23
Interceção		<b>-4778.70</b>	
Declive		<b>18963.80</b>	
Coeficiente de Correlação (r)		<b>0.999</b>	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		<b>0.999</b>	
Limites de Interceção no IC <sub>95%</sub>		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-7887.55	-1669.86

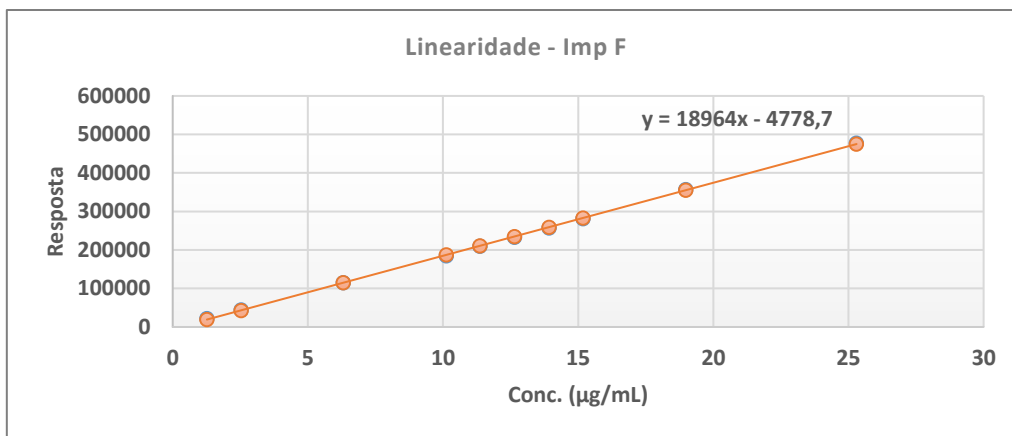


Figura 3.35 Recta da Regressão Linear – Imp F.

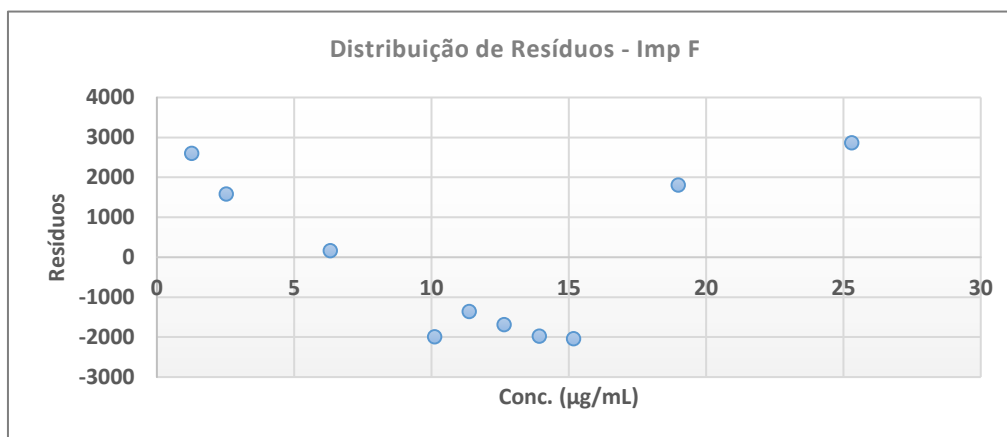


Figura 3.36 Distribuição de Resíduos – Imp F.

Tabela 3.33 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp G.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	2.54	10126.00	9.41
2	6.34	29639.33	6.16
3	10.16	48855.67	1.04
4	11.42	55244.67	6.75
5	12.70	62811.67	0.93
6	13.98	68553.33	0.68
7	15.24	74095.67	1.86
8	19.06	97171.67	3.94
9	25.40	127632.33	2.67
Interceção		<b>-3358.82</b>	
Declive		<b>5172.54</b>	
Coeficiente de Correlação (r)		<b>0.999</b>	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		<b>0.999</b>	
Limites de Interceção no IC 95%		Inferior	Superior
		-5117.26	-1600.39

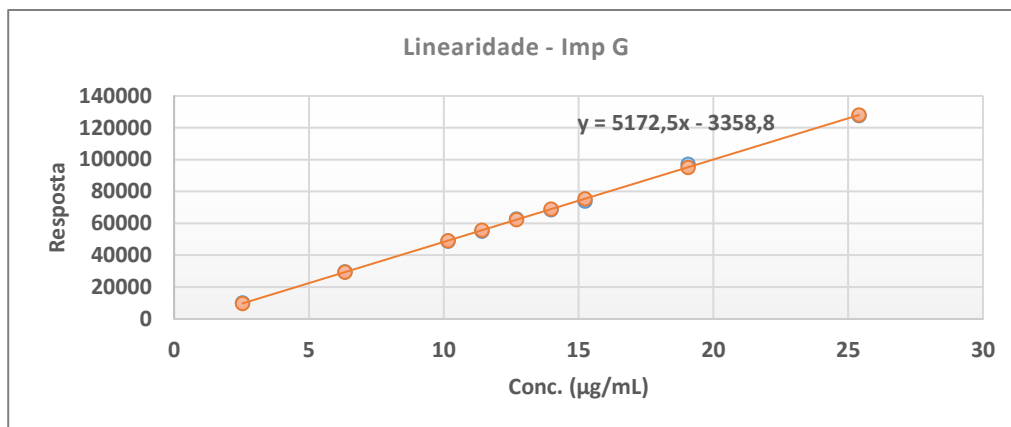


Figura 3.37 Recta da Regressão Linear – Imp G.

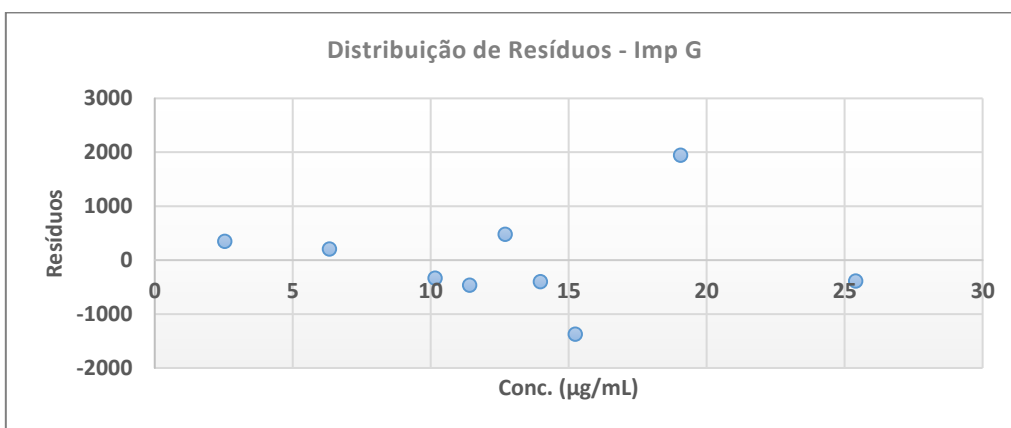


Figura 3.38 Distribuição de Resíduos – Imp G.

Tabela 3.34 Resultados da Linearidade do ensaio de Compostos Relacionados – Imp I.

Solução	Concentração (µg/mL)	Média	RSD (%)
1	1.22	15735.33	1.24
2	2.44	27855.33	0.41
3	6.08	66023.67	0.70
4	9.74	103711.33	0.13
5	10.95	115968.00	0.16
6	12.18	128510.33	0.18
7	13.40	141482.67	0.07
8	14.61	154162.67	0.05
9	18.27	192783.67	0.05
10	24.35	261022.33	0.15
Interceção		1421.17	
Declive		10536.69	
Coeficiente de Correlação (r)		0.999	
Coeficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )		0.999	
Limites de Interceção no IC 95%		Inferior	Superior
		-771.98	3614.32

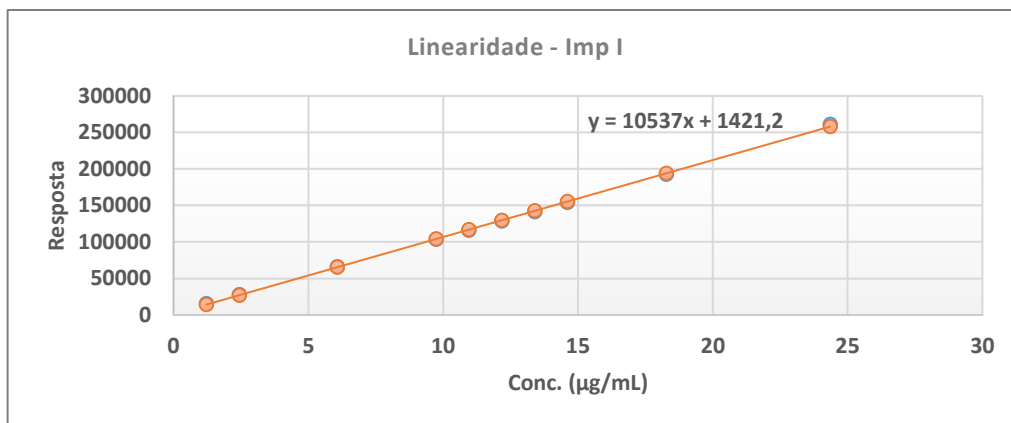


Figura 3.39 Recta da Regressão Linear – Imp I.

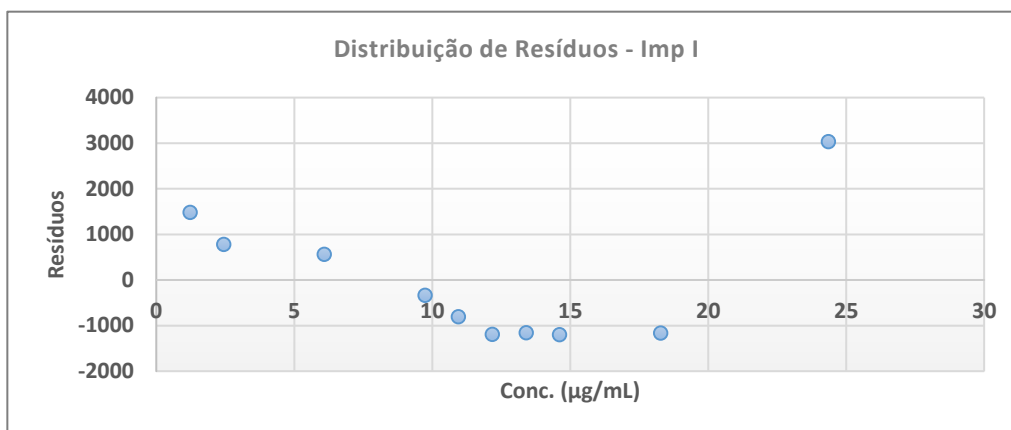


Figura 3.40 Distribuição de Resíduos – Imp I.

#### - Conclusão

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas cumprindo os critérios de aceitação.

#### 3.2.8.Factor de Resposta

Para cada impureza foi ainda calculado o fator de resposta. Este foi obtido pela razão entre o valor do declive da correlação linear de cada impureza pelo valor da correlação linear obtida para a reta das soluções da substância ativa.

- *Resultados*

Tabela 3.35 Fatores de resposta das impurezas conhecidas.

Composto	Declive	Fator de Resposta	Fator de Resposta Corrigido
Ativo	12393.53	-	-
Imp A	4542.90	<b>0.36</b>	0.36
Imp B	6735.75	<b>0.54</b>	0.54
Imp C	18164.78	<b>1.46</b>	<b>1.28</b>
Imp D	8122.43	<b>0.65</b>	0.65
Imp F	18963.80	<b>1.53</b>	1.53
Imp G	5172.54	<b>0.42</b>	0.42
Imp I	10536.69	<b>0.85</b>	0.85

### 3.2.9. Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado pela análise da repetibilidade do sistema de uma solução com concentração conhecida (nível mínimo para o qual o mesmo é identificado).

- *CrITÉrios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) menor ou igual a 20.0%;

Razão sinal-ruído superior a 3.0.

- *Resultados*

Nas tabelas abaixo apresentados encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 3.36 Limites de Detecção – Concentrações.

Composto	Limite de Detecção	
	( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	(%)
Ativo	0.05	0.004
Imp A	0.13	0.010
Imp B	0.13	0.010
Imp C	0.13	0.010
Imp D	0.31	0.025
Imp F	0.13	0.010
Imp G	0.25	0.020
Imp I	0.13	0.010

Tabela 3.37 Resultados dos Limites de Detecção.

Injeção	Área							
	Ativo	Imp A	Imp B	Imp C	Imp D	Imp F	Imp G	Imp I
1	697	538	867	1364	2592	1796	1202	492
2	676	541	856	1370	2631	1483	1291	497
3	679	535	882	1360	2667	1485	1208	555
4	684	552	872	1425	2665	1584	1245	547
5	694	540	859	1493	2523	1928	1226	560
6	704	544	884	1576	2589	1893	1284	530
<b>Média</b>	<b>689.00</b>	<b>541.67</b>	<b>870.00</b>	<b>1431.33</b>	<b>2611.17</b>	<b>1694.83</b>	<b>1242.67</b>	<b>530.17</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.11</b>	<b>0.06</b>	<b>0.12</b>	<b>0.09</b>	<b>0.05</b>	<b>0.20</b>	<b>0.04</b>	<b>0.29</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1.60</b>	<b>1.09</b>	<b>1.33</b>	<b>6.10</b>	<b>2.10</b>	<b>11.93</b>	<b>3.05</b>	<b>5.56</b>
<b>S/N</b>	<b>5.11</b>	<b>5.63</b>	<b>6.39</b>	<b>6.34</b>	<b>4.47</b>	<b>6.53</b>	<b>4.96</b>	<b>9.54</b>

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem com os critérios de aceitação.

### 3.2.10. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado pela análise da repetibilidade do sistema de uma solução com concentração conhecida.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) menor ou igual a 10.0%;

Razão sinal-ruído superior a 10.0.

- *Resultados*

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas abaixo.

Tabela 3.38 Limites de Quantificação – Concentrações.

Composto	Limite de Quantificação	
	( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	(%)
Ativo	0.16	0.013
Imp A	0.38	0.030
Imp B	0.38	0.030
Imp C	0.38	0.030
Imp D	0.94	0.075
Imp F	0.38	0.030
Imp G	0.75	0.060
Imp I	0.38	0.030

Tabela 3.39 Resultados dos Limites de Quantificação.

Injeção	Área							
	Ativo	Imp A	Imp B	Imp C	Imp D	Imp F	Imp G	Imp I
1	2026	1632	2741	5843	7577	5915	3426	6885
2	2008	1639	2747	6034	7599	5788	3291	6978
3	2009	1630	2744	5887	7586	5877	3412	6870
4	2046	1639	2749	5848	7573	5894	3254	6981
5	2009	1639	2759	5709	7578	5901	3413	6992
6	2056	1637	2751	5824	7591	5874	3294	6963
<b>Média</b>	<b>2025.67</b>	<b>1636.00</b>	<b>2748.50</b>	<b>5857.50</b>	<b>7584.00</b>	<b>5874.83</b>	<b>3348.33</b>	<b>6944.83</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.11</b>	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1.04</b>	<b>0.24</b>	<b>0.23</b>	<b>1.80</b>	<b>0.13</b>	<b>0.77</b>	<b>2.29</b>	<b>0.77</b>
<b>S/N</b>	<b>11.09</b>	<b>15.84</b>	<b>20.54</b>	<b>22.75</b>	<b>14.13</b>	<b>22.94</b>	<b>17.51</b>	<b>62.78</b>

- *Conclusão*

Os resultados obtidos para o limite de Quantificação cumprem com os critérios de aceitação.

### 3.2.11. Robustez

A robustez foi determinada pela análise de seis soluções da substância ativa preparadas à concentração das impurezas conhecidas (1.0%) e das desconhecidas (0.1%). Estas foram analisadas pelo método original e por métodos em que foram realizadas ligeiras alterações aos parâmetros do método original (fluxo e temperatura da coluna). Também foi avaliada a estabilidade intra-diária da solução padrão pela variação da percentagem de resposta do padrão obtido ao longo do tempo.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 10.0%.

Na análise da estabilidade intra-diária da solução padrão o desvio padrão relativo (RSD) menor ou igual que 3.0%.

- *Resultados*

Nas duas tabelas abaixo encontram-se os resultados obtidos para a Robustez do ensaio de Compostos Relacionados.

Tabela 3.40 Robustez do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas desconhecidas (0.1%).

<b>Condições Alteradas</b>	<b>Concentração (%) (A1, A2, A3)</b>	<b>Média (%)</b>	<b>S.D. (%)</b>	<b>R.S.D (%)</b>
<b>Método Original</b>	99.74 97.83 97.84	98.47	1.10	1.12
<b>Fluxo (1.3 mL/min)</b>	100.52 98.31 97.99	98.94	1.38	1.39
<b>Fluxo (1.7 mL/min)</b>	101.08 98.77 98.10	99.32	1.56	1.57
<b>Temperatura da coluna (38 °C)</b>	99.14 97.52 98.96	98.54	0.89	0.90
<b>Temperatura da coluna (42 °C)</b>	100.76 98.73 98.10	99.20	1.39	1.40
<b>Média (%)</b>	<b>98.89</b>			
<b>S.D. (%)</b>	<b>1.14</b>			
<b>R.S.D. (%)</b>	<b>1.16</b>			

Tabela 3.41 Robustez do ensaio de Compostos Relacionados – Ativo à concentração das impurezas conhecidas (1.0%).

<b>Condições Alteradas</b>	<b>Concentração (%) (A1, A2, A3)</b>	<b>Média (%)</b>	<b>S.D. (%)</b>	<b>R.S.D (%)</b>
<b>Método Original</b>	98.68 97.87 99.34	98.63	0.74	0.75
<b>Fluxo (1.3 mL/min)</b>	99.76 98.31 99.60	99.22	0.80	0.80
<b>Fluxo (1.7 mL/min)</b>	100.43 99.11 100.51	100.02	0.79	0.79
<b>Temperatura da coluna (38 °C)</b>	100.85 99.41 101.11	100.46	0.92	0.91
<b>Temperatura da coluna (42 °C)</b>	98.80 97.31 98.75	98.29	0.85	0.86
<b>Média (%)</b>	<b>99.32</b>			
<b>S.D. (%)</b>	<b>1.09</b>			
<b>Condições Alteradas</b>	<b>1.10</b>			



Foi avaliada a estabilidade da solução padrão ao longo do tempo conforme resultados apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3.42 Estabilidade intra-diária da solução padrão.

<i>Solução Padrão</i>		
<b>Tempo (horas)</b>	<b>Área</b>	<b>Desvio (%)</b>
0	16507.3	---
4	16445.5	<b>-0.37</b>
8	16292.5	<b>-1.30</b>
16	16439.0	<b>-0.41</b>
20	16566.0	<b>+0.35</b>
<b>Média</b>	16450.07	---
<b>RSD (%)</b>	0.62	---

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas. A solução padrão é estável no mínimo até 20 horas depois de preparada.

### 3.3. EVIDÊNCIA DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO COMO INDICADOR DE ESTABILIDADE

De modo a avaliar se o controlo de qualidade a que o medicamento é sujeito é adequado para a deteção e quantificação de variações de teor de ativo, das impurezas e potenciais produtos de degradação submeteram-se várias amostras de matéria-prima e produto acabado a diferentes tipos de degradação forçada tendo estas sido posteriormente quantificadas pelo método de doseamento e pelo método de compostos relacionados.

As condições de degradação utilizadas foram: Temperatura, Humidade, luz, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação.

Nas tabelas 3.43 e 3.44 estão resumidos os resultados obtidos para a quantificação de doseamento e compostos relacionados na matéria-prima e produto acabado submetidas às referidas condições.

Em anexo pode-se encontrar informação mais detalhada e os vários cromatogramas obtidos durante a realização do estudo das degradações forçadas.

Tabela 3.43 Resultados das degradações forçadas – Produto Acabado.

<b>Condições de Degradação</b>	<b>Doseamento (%)</b>	<b>Compostos Relacionados (%)</b>
<b>Sem degradação induzida</b>	100.24	2.44
<b>Suntest 24 horas</b>	98.20	2.61
<b>Suntest 48 horas</b>	98.74	2.77
<b>T=50°C, 3 dias</b>	97.39	2.78
<b>T=50°C, 7 dias</b>	98.48	2.72
<b>HR=85%, 3 dias</b>	98.76	2.48
<b>HR=85%, 7 dias</b>	100.56	2.06
<b>HCl, 0 horas</b>	89.78	7.62
<b>HCl, 3 horas</b>	83.77	11.36
<b>NaOH, 0 horas</b>	93.18	10.22
<b>NaOH, 3 horas</b>	92.64	11.43
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0 horas</b>	40.48	52.65
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 horas</b>	35.02	54.02

Tabela 3.44 Resultados das degradações forçadas – Matéria-Prima

<b>Condições de Degradação</b>	<b>Doseamento (%)</b>	<b>Compostos Relacionados (%)</b>
<b>Sem degradação induzida</b>	100.37	0.94
<b>Suntest 24 horas</b>	100.23	0.99
<b>Suntest 48 horas</b>	100.09	1.00
<b>T=50°C, 3 dias</b>	100.23	1.01
<b>T=50°C, 7 dias</b>	98.81	0.92
<b>HR=85%, 3 dias</b>	99.51	0.90
<b>HR=85%, 7 dias</b>	102.78	0.92
<b>HCl, 0 horas</b>	91.45	4.90

<b>HCl, 3 horas</b>	85.03	8.70
<b>NaOH, 0 horas</b>	95.83	6.44
<b>NaOH, 3 horas</b>	94.96	7.06
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0 horas</b>	37.6	45.81
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 horas</b>	36.86	42.69

- *Conclusão*

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o método é adequado para monitorizar a estabilidade do produto acabado pois nas amostras em que ocorreu a degradação da substância ativa, verifica-se que o método é sensível, na deteção e quantificação das reduções do teor do princípio ativo, bem como é adequado para deteção dos acréscimos de impurezas em produtos de degradação.

Conclui-se que a via de degradação oxidativa é a que causa maior redução do teor de ativo contido no medicamento e consequentemente o aumento de compostos relacionados ou produtos de degradação.

### 3.4. DISSOLUÇÃO

O ensaio de dissolução consiste em submeter um número definido de unidades do medicamento, individualmente, a um conjunto de condições previamente definidas, e medir a quantidade de substância ativa libertada em função do tempo. Foi desenvolvido pela necessidade de ter uma forma de fazer uma avaliação *in vitro* da performance e velocidade de libertação da substância activa contida no medicamento – dados que são posteriormente correlacionáveis com os resultados obtidos na avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência verificada nos estudos *in vivo*. Desta forma, os ensaios de dissolução apresentam um papel relevante no controlo da qualidade e no desenvolvimento e optimização das formulações e que permitem de uma forma sistematizada e reprodutível avaliar a *performance* do medicamento, mimetizando o sistema *in vivo*. Posto isto, ao longo dos tempos desenvolveram-se sistemas de dissolução, com diversos equipamentos e condições. Na Farmacopeia Europeia estão descritos ensaios de dissolução para as formas farmacêuticas sólidas orais (comprimidos e cápsulas) bem como para outras formas farmacêuticas. São ainda indicadas as condições experimentais tais como o volume do líquido de dissolução, a velocidade de agitação, o intervalo de tempo para recolha da amostra, a quantidade de solução de amostra e o método analítico a usar para a quantificação do fármaco.<sup>[16]</sup>

A validação do ensaio de compostos relacionados foi efetuada, tendo em conta que a concentração de trabalho é de 0.05 mg/mL em substância ativa.

- *Condições do ensaio de Dissolução*

Tabela 3.45 Condições do ensaio de dissolução.

<b>Aparelho</b>	Pás (n.º 2)
<b>Meio de dissolução</b>	Água
<b>Volume</b>	900 mL
<b>Velocidade de rotação</b>	75 rpm
<b>Temperatura</b>	37,0 °C ± 0,5 °C
<b>Tempo</b>	30 minutos

- *Condições cromatográficas:*

Tabela 3.46 Condições cromatográficas para o ensaio de Dissolução

<b>Coluna</b>	Symmetry C18, 150 mm x 4.6 mm; 5 µm
<b>Fluxo</b>	1 mL/min
<b>Volume de injeção</b>	10 µL
<b>Fase Móvel</b>	Solução A: Solução B (1:39, v/v)
<b>Temperatura da coluna</b>	40 °C
<b>Detetor</b>	UV
<b>Comprimento de onda</b>	230 nm
<b>Tempo da corrida</b>	10 minutos
<b>Solvente</b>	Solução B

- *Preparação de soluções*

**Fase Móvel**

A solução A e a solução B são misturados na proporção de 1:39 (v/v) respetivamente.

Solução A: Acetonitrilo.

Solução B: 6.8 g/L de fosfato de potássio monobásico em água. Ajustar o pH para 5.0 ± 0.1 com uma solução de hidróxido de potássio a 45% (w/w).

### **Solução padrão**

Pesar rigorosamente 50 mg de padrão de ativo e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com a solução B e colocar no ultrassons durante 5 minutos. Transferir 2.0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20.0 mL e diluir com o mesmo solvente.  $C \approx 0.05 \text{ mg/mL}$ .

### **Solução amostra**

Realizar o ensaio com 6 comprimidos. Colocar 1 comprimido em cada copo de dissolução, e programar o aparelho para as condições do ensaio de dissolução. Remover uma alíquota de 10 mL de cada copo de dissolução. Transferir 2.0 mL de cada solução para um balão volumétrico de 50.0 mL e completar o volume com solução B.

Para o ensaio de Dissolução os parâmetros validados foram a adequabilidade do sistema, a especificidade, a repetibilidade do sistema, a repetibilidade do ensaio, a precisão intermédia, a exatidão, a linearidade, e a robustez.

#### **3.4.1. Adequabilidade do sistema**

A adequabilidade do sistema foi determinada através da injeção em sextuplicado de uma solução padrão preparada à concentração de trabalho estabelecida, calculando-se os parâmetros cromatográficos para os seis cromatogramas.

##### *- Critérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 1.5%;

Fator de simetria (T) inferior a 2.5.

##### *- Resultados*

Na tabela 3.47 estão apresentados os resultados obtidos para a adequabilidade do Sistema do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.47 Resultados da Adequabilidade do Sistema para o ensaio de Dissolução.

Injeção	<i>Solução Padrão</i>				
	T.R (min)	Área	Fator de Capacidade	Fator de Simetria	Pratos teóricos
1	3.52	668745	1.46	1.12	5842
2	3.53	668836	1.47	1.12	5809
3	3.53	667975	1.47	1.12	5815
4	3.52	663379	1.46	1.13	5791
5	3.53	661078	1.47	1.13	5815
6	3.53	661660	1.47	1.13	5822
<b>Média</b>	<b>3.53</b>	<b>665278,83</b>	<b>1.47</b>	<b>1.13</b>	<b>5815,67</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.15</b>	<b>0.55</b>	<b>0.35</b>	<b>0.49</b>	<b>0.29</b>

- *Conclusão*

O sistema cromatográfico demonstrou cumprir com os parâmetros que caracterizam a adequabilidade do sistema.

### 3.4.2. Especificidade

De modo a confirmar a especificidade do método analítico foram injetadas as seguintes soluções: solução padrão, solução amostra, solução de placebo, meio de dissolução e branco.

- *Critérios de aceitação*

Ausência de picos interferentes ao tempo de retenção do pico principal.

- *Resultados*

Os resultados obtidos para a especificidade do ensaio de dissolução encontram-se na tabela e figuras abaixo apresentados.

Tabela 3.48 Resultados da Especificidade para o ensaio de Dissolução.

No.	Nome	T.R. (min)	Figura
1	Solução Padrão	3.52	Figura 3.41
2	Solução Amostra	3.52	Figura 3.42
3	Solução de Placebo	-	Figura 3.43
4	Meio de dissolução	-	Figura 3.44
5	Branco	-	Figura 3.45

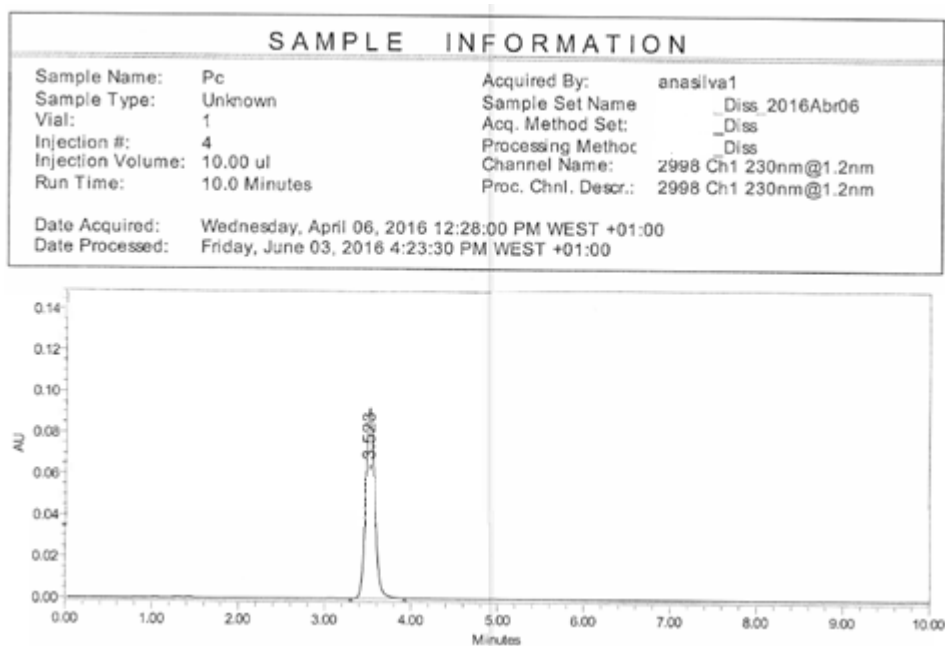


Figura 3.41 Cromatograma da Solução Padrão – Dissolução.

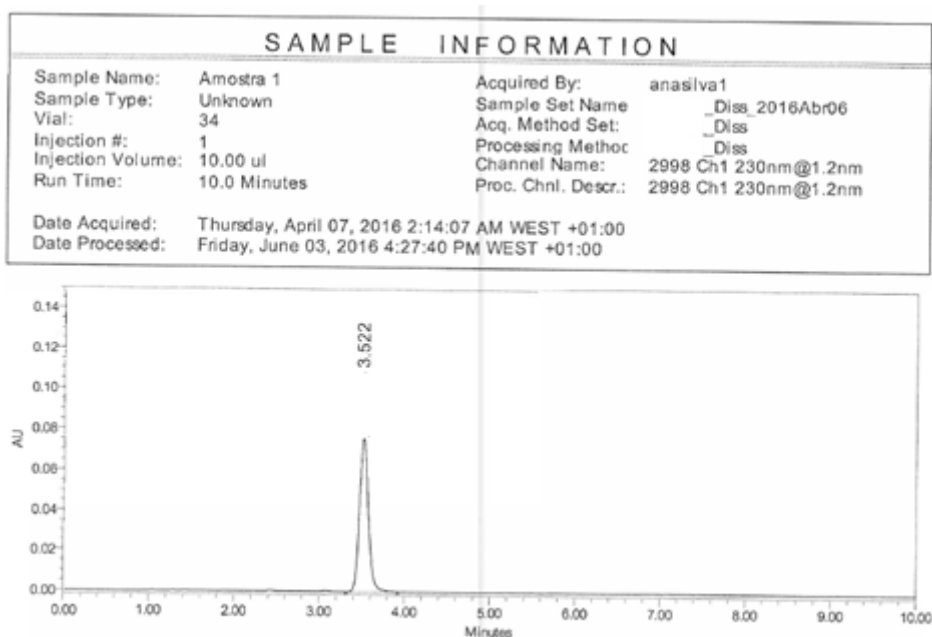


Figura 3.42 Cromatograma da Solução Amostra – Dissolução.

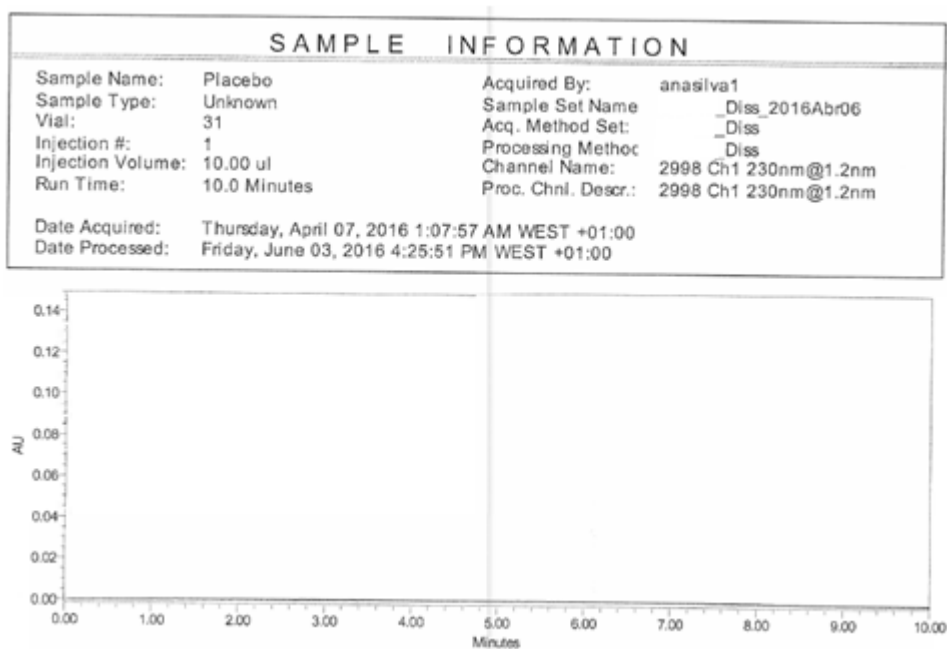


Figura 3.43 Cromatograma da Solução de Placebo – Dissolução.

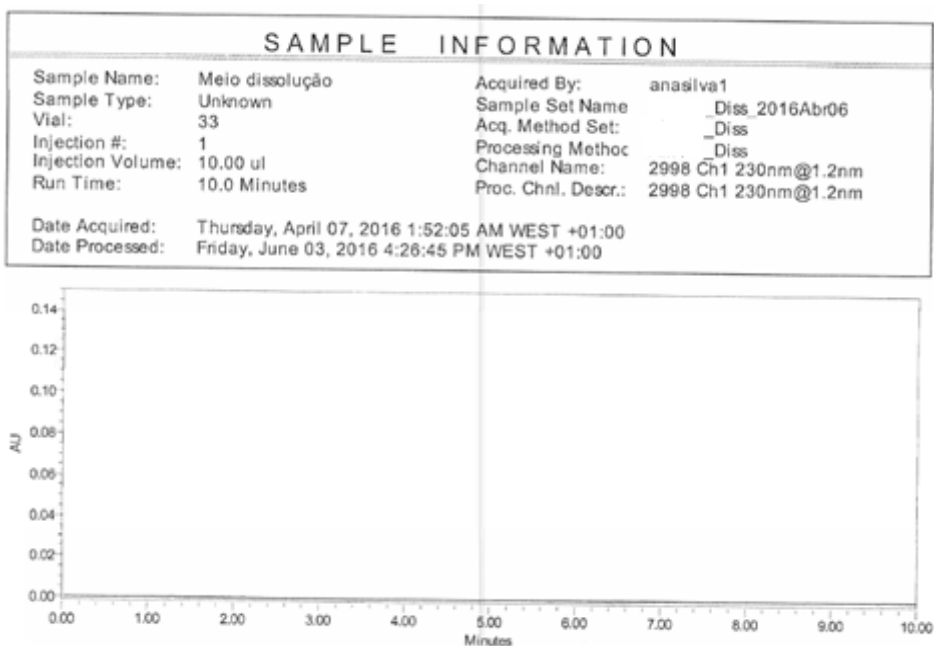


Figura 3.44 Cromatograma do Meio de Dissolução– Dissolução.



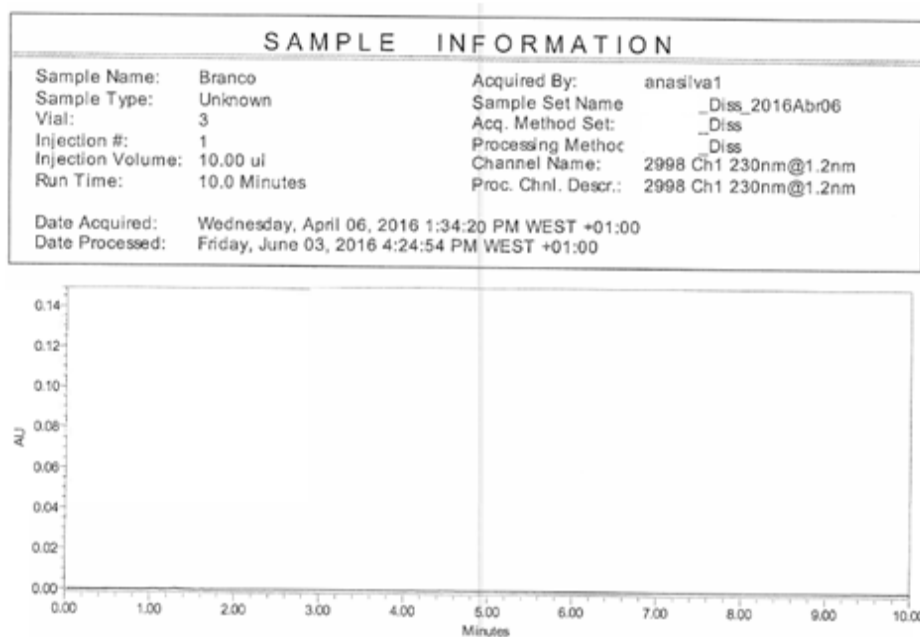


Figura 3.45 Cromatograma do Branco – Dissolução.

#### - Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas pode-se concluir que não há interferentes no tempo de retenção do pico principal.

### 3.4.3. Repetibilidade do Sistema

A repetibilidade do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão.

#### - Critérios de aceitação

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 1.5%.

#### - Resultados

Na tabela 3.49 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.49 Resultados da Repetibilidade do Sistema para o ensaio de Dissolução.

Injeção	<i>Solução Padrão</i>	
	T.R (min)	Área
1	3.52	668745
2	3.53	668836
3	3.53	667975
4	3.52	663379
5	3.53	661078
6	3.53	661660
<b>Média</b>	<b>3.53</b>	<b>665278.83</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.15</b>	<b>0.55</b>

- *Conclusão*

Os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema cumprem os critérios de aceitação estabelecidos.

#### 3.4.4. Repetibilidade do Ensaio

A repetibilidade do método foi confirmada pela preparação de seis amostras à concentração de trabalho.

- *Crítérios de aceitação*

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%.

- *Resultados*

Na tabela 3.50 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do ensaio.

Tabela 3.50 Resultados da Repetibilidade do Ensaio para o ensaio de Dissolução.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	82.56
2	83.36
3	82.91
4	83.01
5	82.91
6	82.92
<b>Média (%)</b>	<b>82.95</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0.26</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0.31</b>

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação.

### 3.4.5. Precisão Intermédia

De modo a confirmar a precisão intermédia foram preparadas seis amostras à concentração de trabalho por um segundo analista, num equipamento diferente e num dia diferente.

- *Critérios de aceitação*

Para um total de seis determinações desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.0%;  
Para o total de doze determinações desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2.5%.

- *Resultados*

Na tabela 3.51 estão apresentados os resultados obtidos pelos dois analistas para a precisão intermédia do método de Dissolução.

Tabela 3.51 Resultados da Precisão Intermédia do ensaio de Dissolução.

Amostra	Concentração (%)	
	Analista 1	Analista 2
1	82.6	79.7
2	83.4	79.0
3	82.9	79.2
4	83.0	78.7
5	82.9	79.0
6	82.9	79.7
<b>Média (%)</b>	82.95	79.22
<b>SD (%)</b>	0.26	0.41
<b>RSD (%)</b>	0.31	0.51
<b>Média (%)</b>	<b>81.08</b>	
<b>SD (%)</b>	<b>1.97</b>	
<b>RSD (%)</b>	<b>2.43</b>	

- *Conclusão*

Os resultados obtidos para a precisão intermédia cumprem os critérios de aceitação.

### 3.4.6.Exatidão

A exatidão foi determinada através da preparação de nove soluções de placebo fortificadas com ativo e testada a três níveis de concentração (50%, 100% e 150% da concentração de trabalho).

- *Crítérios de aceitação*

A percentagem de recuperação do ativo deve encontrar-se entre 95%-105%.

- *Resultados*

Na tabela abaixo estão apresentados os resultados obtidos para a exatidão do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.52 Resultados da Exatidão do ensaio de Dissolução.

Nível Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação %	Amostra 1	100.79	99.51	98.97
	Amostra 2	101.82	101.69	97.76
	Amostra 3	101.20	102.19	98.11
9 Determinações				
Média (%)		100.23		
SD (%)		1.67		
RSD (%)		1.67		

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem com os critérios de aceitação.

### 3.4.7.Linearidade

Para o estudo da linearidade foram preparadas várias soluções de concentração crescente, sendo cada solução injetada em triplicado. De modo a obter os parâmetros a avaliar foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear).

- *Crítérios de aceitação*

Coeficiente de correlação (r) maior ou igual do que 0.99;

Resíduos distribuídos aleatoriamente em torno do zero.

- Resultados

Na tabela e gráficos abaixo apresentados encontram-se os resultados obtidos para a linearidade do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.53 Resultados da Linearidade do ensaio de Dissolução.

Solução	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	25.04	327697.333	0.21
2	40.06	528181.000	0.13
3	45.07	588408.667	0.13
4	50.08	649685.333	0.05
5	55.09	666437.667	0.15
6	60.10	792202.333	0.25
7	75.12	980436.333	0.18
<b>Interceção</b>		<b>2617.270</b>	
<b>Declive</b>		<b>12878.627</b>	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>		<b>0.99</b>	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>		<b>0.99</b>	
<b>Limites de Interceção no IC 95%</b>		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
		-75723.865	80958.404

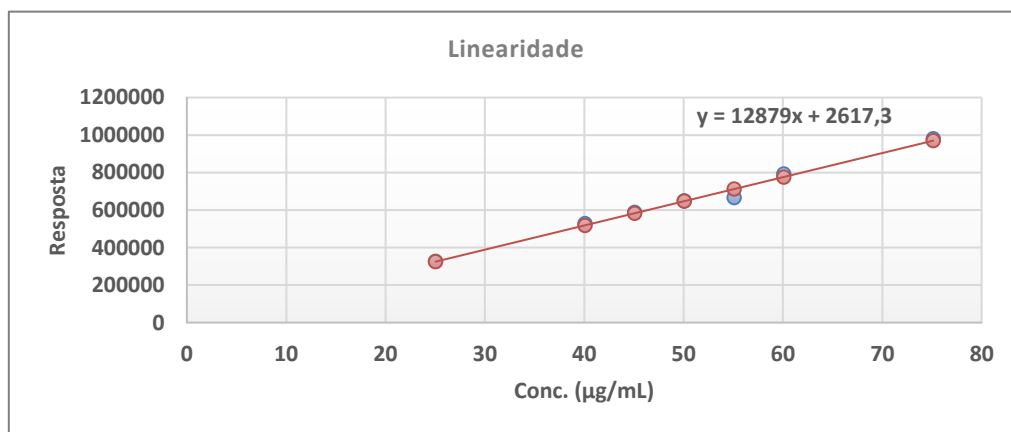


Figura 3.46 Recta da Regressão Linear – Dissolução.

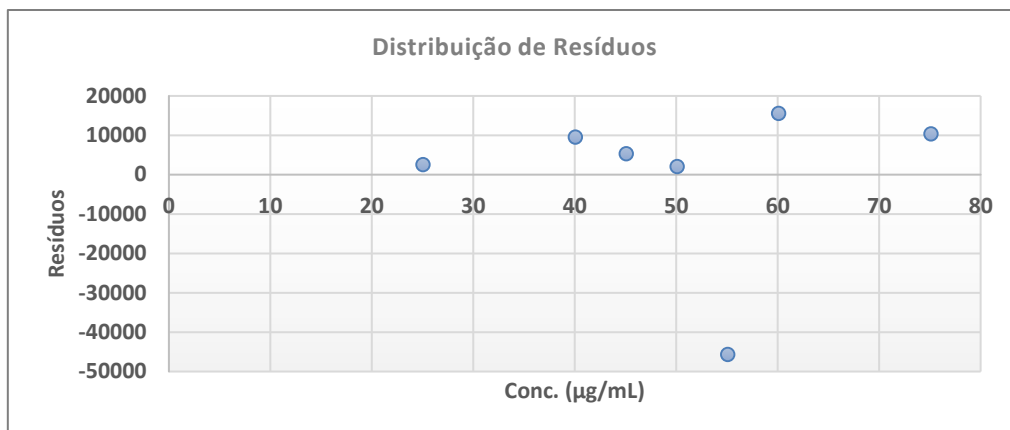


Figura 3.47 Distribuição de Resíduos – Dissolução.

#### - Conclusão

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas cumprindo os critérios de aceitação.

### 3.4.8. Robustez

A robustez do método de dissolução foi determinado pela preparação de três amostras que foram analisadas pelo método original e por métodos em que foram realizadas ligeiras alterações aos parâmetros do método original (fluxo, temperatura da coluna e composição da fase móvel).

#### - Critérios de aceitação

Desvio em relação a resposta inicial inferior a 3.0 %.

#### - Resultados

Na tabela 3.54 estão apresentados os resultados obtidos para a Robustez.

Tabela 3.54 Resultados da Robustez do ensaio de Dissolução.

<b>Condições Alteradas</b>	<b>Concentração (%) (A1, A2, A3)</b>	<b>Média (%)</b>	<b>S.D. (%)</b>	<b>R.S.D (%)</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>
<b>Método Original</b>	99.51 101.69 102.19	101.13	1.43	1.41	96.79 – 105.47
<b>Fluxo (1.2 mL/min)</b>	99.64 101.79 102.04	101.16	1.32	1.30	97.14 – 105.17
<b>Fluxo (0.8 mL/min)</b>	100.01 102.55 102.59	101.72	1.48	1.45	97.22 – 106.21
<b>Temperatura da coluna (38 °C)</b>	99.36 101.39 102.25	101.00	1.48	1.47	96.49 – 105.51
<b>Temperatura da coluna (42 °C)</b>	99.8 101.98 102.46	101.41	1.42	1.40	97.1 – 105.73
<b>Composição da Fase Móvel (0.5:39.5)</b>	99.55 101.7 101.42	100.89	1.17	1.16	97.33 – 104.45
<b>Composição da Fase Móvel (1.5:38.5)</b>	99.92 102.08 102.66	101.55	1.44	1.42	97.16 – 105.95
<b>Média (%)</b>	<b>101.27</b>				
<b>S.D. (%)</b>	<b>1.20</b>				
<b>R.S.D. (%)</b>	<b>1.19</b>				

- *Conclusão*

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação, podendo-se verificar que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas.

#### **4. CONCLUSÕES**

O método de doseamento da substância ativa por HPLC demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação e apresentando para todos os parâmetros resultados satisfatórios.

O método de compostos relacionados por HPLC demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação e apresentando para todos os parâmetros resultados satisfatórios.

Ambos os métodos demonstraram ser adequados para monitorizar a estabilidade do produto, tendo capacidade de detetar e quantificar quer reduções do teor de ativo, quer o aumento de produtos de degradação.

Por fim o método de dissolução por HPLC demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação e apresentando para todos os parâmetros resultados satisfatórios.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Leo Levi, George C. Walker, L. I. Pugsley (1964), *Quality Control of Pharmaceuticals*, Canad. Med. Ass. J., vol. 91: pp 781 - 785
- [2] U.S. Food & Drugs Administration (2014), *GUIDE TO INSPECTIONS OF PHARMACEUTICAL QUALITY CONTROL LABORATORIES*, Pharmaceutical Quality Control Labs (7/93), consultado em 10 de Setembro de 2016:  
<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074918.htm>
- [3] Instituto Português da Qualidade (2014), *Programa Nacional de Acompanhamento de Boas Práticas de Laboratório*, consultado em 29 de Agosto de 2016:  
<http://www1.ipq.pt/PT/Metrologia/Pages/BPL00.aspx>
- [4] Infarmed, *Certificação de conformidade com as Boas Práticas de Laboratório, de acordo com os princípios da OCDE, para a área farmacêutica*, consultado em 29 de Agosto de 2016:  
[http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO\\_DO\\_MERCADO/INSPECCAO/LABORATORIO\\_CONTROLO\\_QUALIDADE](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/INSPECCAO/LABORATORIO_CONTROLO_QUALIDADE)
- [5] U.S. Food & Drugs Administration (2016), *Facts About the Current Good Manufacturing Practices (CGMPs)*, consultado em 15 de Agosto de 2016:  
<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/Manufacturing/ucm169105.htm>
- [6] Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (1994), *Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods*
- [7] Tecnimede Group, consultado em 3 de Setembro:<http://www.tecnimede.com/>
- [8] Rafael Berbert Chust (1990), *Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)*, BOLETIM SPQ, 39: p 39- 53
- [9] Bengi Uslu *et al* (2012), *Analytical Method Development and Validation of Pharmaceutical Analysis Using Chromatographic Techniques*, Hindawi Publishing Corporation Chromatography Research International Volume 2012, Article ID 948129, 1 page doi:10.1155/2012/948129
- [10] US Pharmacopeia, *Chromatography*, consultado em 18 de Setembro:  
[http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp35/data/v35300/usp35nf30s0\\_c621.html#usp35nf30s0\\_c621s12](http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp35/data/v35300/usp35nf30s0_c621.html#usp35nf30s0_c621s12)
- [11] Tom Kupiec (2004), *Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography*, International Journal of Pharmaceutical Compounding Vol. 8 No. 3, pp 223 – 227
- [12] Waters, *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?*, consultado em 27 de Agosto de 2016:  
[http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US)
- [13] Ludwig Huber (2010), *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies, Publication Number 5990-5140EN
- [14] Oona McPolin (2009), *Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis*, Mourne Training Services, ISBN: 98-0-9561528-1-7

[15] International Conference On Harmonisation (1994), *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology*, Ich Harmonised Tripartite Guideline

[16] Ricardo Davidson (2004), *Ensaaios de Farmacotecnia*, Infarmed & Ministério da Saúde. Consultado em 20 de Setembro de 2016:

[http://www.infarmed.pt/pt/noticias\\_eventos/eventos/ev\\_11\\_10\\_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo\\_Davidson.pdf](http://www.infarmed.pt/pt/noticias_eventos/eventos/ev_11_10_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo_Davidson.pdf)